

Université de Montréal

Analyse du métabolisme du soufre de la bactérie autotrophique acidophile

***Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 19377**

Par

Rodolfo Frazao

Département de biochimie et médecine moléculaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)

en Biochimie

Décembre, 2015

© Rodolfo Frazao, 2015

Université de Montréal

Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé:

Analyse du métabolisme du soufre de la bactérie autotrophique acidophile

Acidithiobacillus thiooxidans ATCC 19377

Présenté par

Rodolfo Frazao

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Normand Brisson, président-rapporteur

Christian Baron, directeur de recherche

Kevin Wilkinson, membre du jury

SOMMAIRE

Les impacts environnementaux dues à l'extraction minière sont considérables. C'est l'action des microorganismes, en utilisant leur métabolisme du soufre sur les déchets miniers, qui engendre les plus grands défis. Jusqu'à présent, peu de recherches ont été effectuées sur les microorganismes environnementaux pour la compréhension globale de l'action du métabolisme du soufre dans une optique de prévention et de rémédiation des impacts environnementaux de l'extraction minière.

Dans cette étude, nous avons étudié une bactérie environnementale, *Acidithiobacillus thiooxidans*, dans le but de comprendre le métabolisme du soufre selon le milieu de culture et le niveau d'acidité du milieu. Nous avons utilisé la transcriptomique à haut débit, RNA-seq, en association avec des techniques de biogéochimie et de microscopie à électrons pour déterminer l'expression des gènes codants les enzymes du métabolisme du soufre.

Nous avons trouvé que l'expression des gènes des enzymes du métabolisme du soufre chez ce microorganisme sont dépendantes du milieu, de la phase de croissance et du niveau d'acidité présent dans le milieu. De plus, les analyses biogéochimiques montrent la présence de composés de soufre réduits et d'acide sulfurique dans le milieu. Finalement, une analyse par microscopie électronique révèle que la bactérie emmagasine des réserves de soufre dans son cytoplasme. Ces résultats permettent une meilleure compréhension de son métabolisme et nous rapprochent de la possibilité de développer une technique de prédiction des réactions ayant le potentiel de causer des impacts environnementaux dus à l'extraction minière.

Mots clés :

Environnement, extraction minière, *Acidithiobacillus thiooxidans*, RNA-seq, biogéochimie, soufre, microscopie à électrons, transcriptome

ABSTRACT

The environmental impact of mining extraction is important. The action of microorganisms using their sulfur metabolism to metabolise compounds in mining waste contributes to reactions that may impact water quality and the environment. Few studies have been conducted on environmental microorganisms to advance the global comprehension of their sulfur metabolism in an attempt to study their impact on the environment.

In this study, we cultivate an environmental bacterium, *Acidithiobacillus thiooxidans*, in an attempt to understand its sulfur metabolism in different growth media and at different levels of acidity. We used high-throughput RNA sequencing in association with sulfur biogeochemistry and electron microscopy to determine the expression of the genes encoding sulfur metabolism enzymes.

The expression of genes encoding sulfur metabolism enzymes was media and pH-dependent. Also, the biogeochemical analysis showed the presence of reduced sulfur intermediates and of sulfuric acid in the medium. Finally, an electron microscopic analysis revealed that the bacteria stock sulfur in the cytoplasm. These results resulted in a better comprehension of its sulfur metabolism and it opens the possibility to predict reactions in mining operations that have impact on the environment.

Keywords :

Environment, mining extraction, *Acidithiobacillus thiooxidans*, RNA sequencing, biogeochemistry, sulfur, electron microscopy, transcriptome

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE	iii
ABSTRACT	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS	xi
REMERCIEMENTS	xvi
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1 L'industrie minière	2
1.2 Drainage minier acide (AMD)	3
1.3 Microorganismes qui métabolisent le soufre	7
1.4 Extraction minière biologique	8
1.5 Diminution du drainage minier acide	10
1.6 Modèle du métabolisme du soufre	11
1.6.1 <i>A. ferrooxidans</i>	11
1.6.2 <i>A. caldus</i>	14
1.6.3 <i>A. thiooxidans</i>	16
1.7 Similitudes et différences entre les différents métabolismes du soufre chez <i>A. ferrooxidans</i> , <i>A. caldus</i> et <i>A. thiooxidans</i>	20
1.8 Description du projet de recherche	21
CHAPITRE 2 ARTICLE	23
2.1 Contributions des auteurs	24

2.2	Abstract	27
2.3	Introduction	28
2.4	Materials & methods	31
2.5	Results	38
2.6	Discussion	45
2.7	Acknowledgements	49
2.8	References	50
2.9	Legends to figures	56
2.10	Tables	59
2.11	Figures	61
2.12	Supplementary information	69
	CHAPITRE 3 ANNEXE - PCR EN TEMPS RÉEL	83
3.1	Design des amorces	84
3.2	Dégradation de l'ADN génomique et synthèse de l'ADN complémentaire	87
3.3	Détermination des paramètres des réactions qPCR	89
3.4	Amplification du gène <i>soxA-1</i> par qPCR	91
	CHAPITRE 4 DISCUSSION	97
	LISTE BIBLIOGRAPHIQUE	102

LISTE DES TABLEAUX

<i>Table I. Assembly and annotation of the draft genome of Acidithiobacillus thiooxidans ATCC 19377</i>	59
<i>Table II. Average FPKM values showing expression of genes from the sulfur metabolism pathway under different growth conditions</i>	60
<i>Table S1. Comparison of the percentage of concordant pair alignments between our assembly and the published assembly with 164 contigs</i>	71
<i>Table S2. Top 50 upregulated genes after growth on elemental sulfur at pH 2.5 as compared to pH 1.5</i>	72
<i>Table S3. Top 50 upregulated genes after growth on thiosulfate at pH 2.5 as compared to elemental sulfur at pH 1.5</i>	73
<i>Table S4. Top 50 downregulated genes after growth on elemental sulfur at pH 2.5 as compared to pH 1.5</i>	74
<i>Table S5. Top 50 downregulated genes after growth on thiosulfate at pH 2.5 as compared to elemental sulfur at pH 1.5</i>	76
<i>Table S6. Top 50 upregulated genes after growth on elemental sulfur at pH 2.5 as compared to thiosulfate at pH 2.5</i>	77
<i>Table S7. Top 50 downregulated genes after growth on elemental sulfur at pH 2.5 as compared to thiosulfate at pH 2.5</i>	78
<i>Table S8. Concentration of the different sulfur species during growth of A. thiooxidans in elemental sulfur medium.</i>	80
<i>Table S9. Concentration of the different sulfur species during growth of A. thiooxidans in thiosulfate medium.</i>	81

Tableau I. Amorces utilisées pour des analyses qPCR sur les gènes du métabolisme du soufre

85

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Phénomène du drainage minier acide_____	4
Figure 1.2. Modèle de l'oxydation du soufre chez <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270_____	13
Figure 1.3. Modèle de l'oxydation du soufre chez <i>A. caldus</i> MTH-04_____	15
Figure 1.4. Modèle de l'oxydation du soufre chez <i>A. thiooxidans</i> A01_____	17
Figure 1.5. Arbre phylogénique basé sur les divergences des séquences protéiques de l'enzyme sulfur oxygenase reductase (SOR) de différentes espèces d'archées et de bactéries_____	18
Figure 1.6. Enzymes du métabolisme du soufre chez <i>A. ferrooxidans</i> , <i>A. caldus</i> et <i>A. thiooxidans</i> _____	19
<i>Figure 1. Growth curves of A. thiooxidans ATCC 19377</i> _____	61
<i>Figure 2. Relative expression of the sulfur metabolism genes</i> _____	62
<i>Figure 3. Representation of the number of upregulated and downregulated genes after growth on elemental sulfur or thiosulfate</i> _____	66
<i>Figure 4. Biogeochemical analysis of the sulfur species during growth of A. thiooxidans ATCC 19377 on elemental sulfur or thiosulfate</i> _____	67
<i>Figure 5. Transmission electron microscopy (TEM) showing sulfur globules inside A. thiooxidans ATCC 19377</i> _____	68
<i>Figure S1. Determination of the viability of A. thiooxidans ATCC 19377 during growth in elemental sulfur or thiosulfate medium</i> _____	69
<i>Figure S2. Energy-dispersive X-ray spectroscopy coupled with transmission electron microscopy (TEM) of a non-sulfur globule region of A. thiooxidans ATCC 19377</i> _____	82
Figure 3.1. Amplification PCR des gènes cibles pour l'analyse qPCR_____	86

Figure 3.2. Électrophorèse sur gel d'agarose de l'extraction de l'ARN total d'une culture d' <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> ATCC 19377	88
Figure 3.3. Programme des réactions de l'analyse qPCR pour le gène <i>soxA-1</i>	90
Figure 3.4. Amplification qPCR du gène <i>soxA-1</i>	92
Figure 3.5. Courbes de dénaturation (<i>melting curve</i>) des amplicons de <i>soxA-1</i>	94
Figure 3.6. Courbe standard de la spécificité des amorces pour le gène <i>soxA-1</i>	96

LISTE DES SIGLES ET DES ABREVIATIONS

% :	Pourcentage
°C :	Degrée Celcius
-RT :	Sans <i>reverse transcriptase</i>
ΣS_{aq} :	<i>total aqueous/dissolved S</i>
aa ₃ :	Cytochrome aa ₃
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMD :	<i>Acid mine drainage</i>
AMP :	Adénosine monophosphate
APS :	Adénylylsulfate
ATP :	Adénosine triphosphate
ARN :	Acide ribonucléique
bc1 :	Cytochrome bc1
bd :	Cytochrome bd
bo ₃ :	Cytochrome bo ₃
bp :	<i>Base pairs</i>
cp :	<i>Crossing point</i>
CycA2 :	Cytochrome c
<i>doxD</i> :	Gène codant pour l'enzyme thiosulfate quinone reductase
DNase I :	Enzyme de dégradation de l'ADN
DsrE :	sulfur transferase DsrE
EDS :	<i>Energy-dispersive X-ray spectroscopy</i>

FPKM :	<i>Fragments per kilobase of transcript per million mapped reads</i>
g :	gramme
<i>gyrA</i> :	Gène codant pour l'enzyme gyrase A
HDR :	heterodisulfide reductase
<i>hdrA</i> :	Gène codant pour la protéine heterodisulfide reductase sous-unité A
<i>hdrB</i> :	Gène codant pour la protéine heterodisulfide reductase sous-unité B
<i>hdrC</i> :	Gène codant pour la protéine heterodisulfide reductase sous-unité C
HiPIP :	<i>high potential iron-sulfur protein</i>
HPLC :	<i>High performance liquid chromatography</i>
ICP-AES :	<i>Inductively coupled argon plasma emission spectrometry</i>
kb :	Kilobase
kV :	Kilovolt
L :	Litre
LOD :	<i>Limit of detection</i>
LOG2 :	Logarithme à base 2
M :	Molaire
mg :	Milligramme
ml :	Millilitre
mM :	Millimolaire
NADH :	Nicotinamide adenine dinucleotide
NDH1 :	Nicotinamide adenine dinucleotide complexe 1
OMP :	Récepteur membranaire pour le soufre élémentaire
PAPSr :	phosphoadenosine phosphosulfate reductase

pb :	Paire de bases nucléotidiques
PCR :	<i>Polymerase chain reaction</i>
QH ₂ :	Ubiquinone
qPCR :	<i>Polymerase chain reaction</i> en temps réel
<i>recA</i> :	Gène codant pour l'enzyme recombinaise A
Rhd :	sulfur transferase Rhd
<i>rho</i> :	Gène codant pour l'enzyme rho (facteur de terminaison de la traduction)
RISCs :	<i>Reduced inorganic sulfur compounds</i>
rpm :	<i>Rounds per minute</i>
SAT :	ATP sulfurylase
SdrA2 :	Protéine accessoire du NADH complexe 1 SdrA2
SDO :	sulfur dioxygenase
SDS :	Sodium dodecyl sulfate
SEM :	<i>Scanning electron microscopy</i>
SOI :	<i>Sulfur oxidizing intermediates</i>
SOR :	sulfur oxygenase reductase
Sox :	<i>sulfur oxidation protein</i>
SoxA :	<i>sulfur oxidation protein A</i>
SoxB :	<i>sulfur oxidation protein B</i>
SoxX :	<i>sulfur oxidation protein X</i>
SoxY :	<i>sulfur oxidation protein Y</i>
SoxZ :	<i>sulfur oxidation protein Z</i>
SQR :	sulfur quinone reductase

TEM :	<i>Transmission electron microscopy</i>
TetH :	tetrathionate reductase
TQO :	thiosulfate quinone oxydoreductase
TQR :	thiosulfate quinone reductase
TST :	rhodanese
TusA :	sulfur transferase TusA
U :	<i>Unit</i>
μl :	Microlitre
μm :	Micromètre
WDS :	<i>Wavelength-dispersive spectroscopy</i>

À mes parents, qui m'ont toujours encouragé à faire ce que j'aime,

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, Dr Christian Baron. Je le remercie d'avoir partagé avec moi son expertise, pour sa disponibilité et tout le temps qu'il a pu m'accorder. Je le remercie de m'avoir supervisé tout au long de ma maîtrise et pour avoir rendu possible mon encadrement à la fois à l'intérieur et hors du milieu universitaire.

J'aimerais également remercier tout ceux qui ont collaboré avec moi sur ce projet de recherche. Tout d'abord, je remercie Dr Lesley Warren et son étudiant, David Camacho, de la Faculté des sciences de l'Université McMaster pour leur expertise en biogéochimie et pour les nombreuses heures à discuter du projet lors de conférences scientifiques canadiennes. Je remercie aussi Dr Lang de la Faculté de médecine de l'Université de Montréal pour m'avoir guidé tout au long de mes études et pour son excellent travail sur l'assemblage et l'annotation du génôme d'*Acidithiobacillus thiooxidans*. Un gros merci au Dr Nanci Antonio et à son étudiant, Aurélien Fouillen, de la Faculté de médecine dentaire de l'Université de Montréal pour la préparation et l'utilisation d'échantillons pour la microscopie électronique.

Un merci tout spécial aux étudiants du laboratoire du Dr Christian Baron, Charline, Bastien, Flore, Mahzad, Ingrid et Arnold, avec qui ce fût un plaisir de partager mes questionnements, scientifiques ou non... J'aimerais aussi remercier Benoit Bessette, agent de recherche au laboratoire, pour ses précieux conseils techniques; surtout quand tout semblait aller de travers. Un gros merci aux post-docs du laboratoire, John et Tarun, pour leur appui et leur aide sur ce projet.

J'aimerais également remercier Philippe Lampron et Audrey Noël pour m'avoir aidé sur certains aspects techniques de mon projet mais aussi pour m'avoir proposé de les aider sur

plusieurs projets éducatifs de l'Université de Montréal. Sans eux ma formation ne serait pas complète.

Merci à tous les employés et étudiants du Département de biochimie et médecine moléculaire de l'Université de Montréal qui m'ont supporté tout au long de mon projet de recherche et merci aux membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce mémoire.

Un énorme merci à mon meilleur ami, Eddy, pour ses précieux conseils irremplaçables et pour m'avoir épaulé à travers chacune des étapes nécessaires à la réalisation de ce mémoire.

Finalement, je remercie ma soeur et mes parents pour leurs encouragements et pour leur écoute tout au long de mes études, mais surtout pour tout le temps qu'ils m'ont accordé pour que je puisse réaliser tous mes projets.

Chapitre 1

INTRODUCTION

1.1 L'industrie minière

L'industrie minière est très importante pour l'économie canadienne. Cette industrie extrait plus de 60 métaux et minéraux liés à la production de biens et services. Le Canada est au premier rang mondial pour la production de potasse et d'uranium et au troisième rang pour la production de diamants (Conseil des ressources humaines de l'industrie minière, 2015). Cette industrie engendre des revenus en impôts pour le gouvernement canadien de plus de huit milliards de dollars par année. De plus, elle a permis de développer certaines régions au Canada comme Val-d'Or et Sudbury. Elle soutient aussi un emploi sur 46 en sol canadien et représente plus de 50% des déplacements dans les chemins de fer et les ports canadiens (Conseil des ressources humaines de l'industrie minière, 2015).

Cependant, l'un des aspects néfastes de l'industrie minière est la création de déchets de l'extraction minière. Par exemple, pour chaque tonne de cuivre extraite du sol, il y a 99 tonnes de «déchets» comme résultats de l'extraction minière (*Environmental Mining Council of British Columbia*, 2000). Ces «déchets» sont des morceaux de roches qui ne contiennent que peu de cuivre. Ils contiennent d'autres éléments du sol terrestre, notamment du soufre ou certains autres métaux/minéraux en petites quantités. La quantité de déchets miniers est encore plus élevée au niveau de l'extraction de métaux précieux comme l'or ou l'argent, puisque ceux-ci requièrent des excavations plus importantes. L'industrie canadienne produit environ deux millions de tonnes de déchets miniers par jour, pour une quantité annuelle de 650 millions de tonnes (*Environmental Mining Council of British Columbia*, 2000).

1.2 Drainage minier acide (AMD)

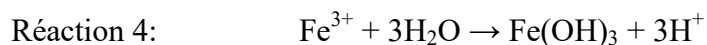
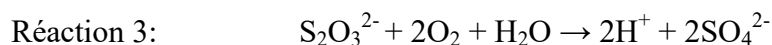
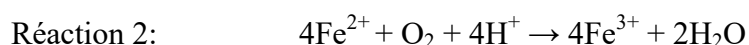
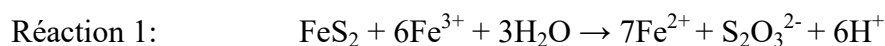
Bien que cette industrie soit importante dans les enjeux économiques et démographiques du Canada, il y a le risque de dommages environnementaux liés aux déchets miniers. Le risque le plus important constitue le drainage minier acide (AMD; *acide mine drainage*).

L'AMD est un processus qui se produit quand les métaux sulfurisés, notamment la pyrite (FeS_2), entrent en contact avec l'oxygène atmosphérique et l'eau. Ces métaux sont stables dans les environnements sans l'oxygène et l'eau, soit dans le sol terrestre à l'abri de l'atmosphère. Cependant, lorsqu'ils sont mis en contact avec ces éléments, après excavation du sol par les industries minières, il en résulte la formation d'acide sulfurique et la solubilisation de métaux lourds (*Environmental Mining Council of British Columbia*, 2000). Typiquement, les déchets sont entreposés dans de vastes champs à l'air libre ou envoyés dans les cours d'eaux proches et il en peut résulter un problème important au niveau de la contamination près du périmètre de la mine. De plus, le phénomène ne s'arrête pas quand la mine cesse ses activités puisqu'il peut y avoir un reflux d'eau et de nouveaux déversements dans les cours d'eaux proches. La plus grande caractéristique du drainage minier acide est la couleur jaune-rougeâtre de l'eau près des installations minières résultant de l'oxydation du fer et du soufre des composés des «déchets» miniers (Figure 1.1.).



Figure 1.1. Phénomène du drainage minier acide. À gauche : Mine de Rio Tinto en Espagne (Valdés *et al.*, 2008). À droite : Mine Mount Washington en Colombie-Britannique (*Environmental Mining Council of British Columbia*, 2000).

La conversion de la pyrite, FeS_2 , en acide sulfurique est l'une des plus communes en ce qui a trait à ce phénomène. C'est l'accélération de l'oxydation de la pyrite par son contact avec l'oxygène atmosphérique et l'eau, qui induit la formation de l'acide sulfurique (Johnson & Hallberg, 2003). Ce processus commence par l'attaque d'ions ferriques sur la pyrite, sans l'aide de l'oxygène, ce qui résulte en l'oxydation de S^{2-} (réaction 1). Cette première réaction ne nécessite aucune action biologique; elle se produit spontanément. Après cette réaction chimique, il y a la réoxydation par l'oxygène des ions ferreux à ferriques (réaction 2) et l'oxydation des composés réduits du soufre, produits intermédiaires de la réaction, jusqu'au produit final, le sulfate (réaction 3) (Johnson & Hallberg, 2005; Hedrich *et al.*, 2011). La réaction 2 se produit par l'action de microorganismes qui réduisent le fer permettant à ce dernier de réattaquer la pyrite en réaction 1. Finalement, la régénération des ions ferriques accélère le processus d'acidification des eaux (réaction 4). À pH très acide, cette réaction peut se produire spontanément ou par l'action de microorganismes (Johnson & Hallberg, 2003).



L'acidification de l'environnement est un processus normal qui survient lorsqu'il pleut ou qu'il neige. L'eau entre en contact avec les métaux sulfurisés présent sur le sol terrestre (par exemple la pyrite) et produit de l'acidité. L'eau acide produite contiendra de l'acide sulfurique et pourrait contribuer à l'acidification normal de l'environnement. L'acidification produite

naturellement n'est pas assez concentrée pour nuire directement à l'environnement. Par contre, lors du processus minier d'extraction des minéraux et des métaux, beaucoup de déchets sont rejetés en dehors de la mine. Cette action augmente la quantité de métaux sulfurisés en contact avec l'oxygène atmosphérique et l'eau entraînant une plus grande acidification. En ce qui concerne les sources majeures d'eau, elles proviennent des équipements d'excavation des industries minières et des nappes phréatiques dans le sol terrestre. Dans les mines en activité, l'eau des nappes phréatiques est envoyé en dehors de la mine par un système de pompage. Cependant, les mines abandonnées comme celles de Rio Tinto en Espagne (Valdés *et al.*, 2008), contribuent à la formation d'eaux acides, car il y a reflux des nappes phréatiques. Elles remontent à la surface par les galeries ou les puits des mines et sont ainsi déversées dans l'environnement. L'eau acide qui se déverse en dehors de la mine contient aussi des métaux lourds comme le fer, le manganèse, le nickel et même l'arsenic rendant le phénomène encore plus dangereux pour l'environnement à cause de la toxicité de certains de ces métaux (Johnson & Hallberg, 2005).

L'acidification des eaux des mines est un processus abiotique et biologique. C'est la combinaison des réactions chimiques spontanées et des réactions enzymatiques des microorganismes qui produit la plus grande concentration d'acidité. Ces microorganismes sont capables d'utiliser directement des composés réduits du soufre pour produire de l'acide sulfurique. Ce sont des microorganismes chimiolithotrophes qui utilisent le soufre comme source d'énergie. Ils oxydent le soufre pour acquérir des équivalents réducteurs, ce qui leur permet de les convertir en énergie par la chaîne de transport des électrons jusqu'à la formation d'ATP par l'ATP synthase. L'oxydation des composés réduits du soufre peut amener jusqu'à huit électrons dans la chaîne de transport des électrons en partant du sulfide (H_2S) et en terminant par le sulfate

(SO_4^{2-}). Certains microorganismes (ex: *Acidithiobacillus ferrooxidans*) sont également capables d'oxyder les ions ferreux. En comparaison, les électrons qui proviennent de l'oxydation des composés réduits du soufre entrent dans la chaîne de transport des électrons à un potentiel électrique plus bas, ce qui permet de produire plus d'ATP par électrons (Dopson & Johnson, 2012).

1.3 Microorganismes qui métabolisent le soufre

Le métabolisme central de la production d'énergie chez les microorganismes environnementaux est le métabolisme du soufre (Rzhepishevskaya *et al.*, 2007). Les organismes qui métabolisent le soufre sont des procaryotes : les bactéries et les archées. Parmi les bactéries, on retrouve les gammaprotéobactéries (ex: *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus caldus* et *Acidithiobacillus ferrivorans*), les firmicutes (ex: *Sulfobacillus* spp.), les aquificae (ex: *Hydrogenobaculum acidophilum*), les actinobactéries (ex: *Microbacterium* spp.) et les bacteroidetes (*Gramella* spp.) (Dopson & Johnson, 2012). Parmi les archées, on retrouve les euryarchaeotas (ex: *Thermoplasma* spp.) et les crenarchaeotas (ex: *Sulfolobus metallicus* et *Acidianus* spp) (Korehi *et al.*, 2013).

De cette liste d'organismes, *A. ferrooxidans* et *A. thiooxidans* sont deux microorganismes très importants pour l'enjeu environnemental du drainage minier acide. Ce sont des bactéries à Gram-négatif, chimiolithotrophes obligatoires et autotrophes, ce qui signifie qu'elles oxydent les substances minérales, non-organiques, pour produire l'énergie et l'assimilation de molécules organiques de CO_2 sans l'utilisation de la lumière. Les molécules organiques riches en énergie, tel le glucose, ne sont pas utilisées par ces bactéries. Bacilles solitaires ou en paires, elles sont de dimension $0,5 \times 1,0 \mu\text{m}$ pour *A. ferrooxidans* mais elles peuvent atteindre jusqu'à $2 \mu\text{m}$ de

longueur pour *A. thiooxidans*. Elles sont mobiles par un seul flagelle polaire. *A. ferrooxidans* est capable de croître en présence d'ions ferreux, de pyrite, de soufre, de minéraux sulfurisés, de thiosulfate et de tétrathionate. Pour ce qui est d'*A. thiooxidans*, il peut croître en présence de soufre élémentaire, de thiosulfate ou de tétrathionate comme source d'énergie (Staley *et al.*, 1989).

Elles sont des bactéries aérobiques strictes, signifiant que la présence de dioxygène est essentielle pour le métabolisme de ces bactéries. Elles utilisent les sels d'ammoniaque comme source d'azote, mais *A. ferrooxidans* peut aussi fixer l'azote atmosphérique. Elles sont capables de fixer le dioxyde de carbone de l'air en utilisant le cycle de Calvin. Elles ont une croissance optimale à une température de 30°C et à un pH de 2. Cependant, elles peuvent vivre dans un environnement plus acide avec un pH de 1 (Staley *et al.*, 1989). Le produit final de leur métabolisme du soufre est le sulfate et des protons, d'où leur rôle prédominant dans le drainage minier acide.

1.4 Extraction minière biologique

Pour augmenter la productivité de l'extraction minière le *biomining* prend de plus en plus de place dans l'extraction minière. Le *biomining* comprend l'utilisation de microorganismes pour la solubilisation de métaux contenus dans les minerais. C'est le pouvoir oxydant des microorganismes (biooxydation) que l'on utilise pour cette tâche (Rawlings & Johnson, 2007). Le *biomining* est une technologie qui génère depuis les 50 dernières années 20% du cuivre mondial. Elle est aussi utilisée pour l'extraction du nickel, du cobalt, de l'uranium, du zinc et de l'or (Hedrich *et al.*, 2011).

Il existe deux types de *biomining*: par des cuves agitées ou par l'irrigation des dépôts de minerais (Rawlings & Johnson, 2007). Dans les deux cas, les minerais contenant les métaux sont mis en contact avec un large volume d'acide et des microorganismes capables d'oxyder ceux-ci. En oxydant le soufre contenu dans le minerai, les métaux sont relâchés et solubilisés dans l'acide. Les compagnies minières recueillent l'acide et récupèrent les métaux. L'acide est ensuite recyclé et le cycle recommence.

Les cuves agitées fournissent un environnement optimal pour la croissance rapide de microorganismes tels *A. thiooxidans*, *A. ferrooxidans*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, *Ferroplasma acidophilum* et *Acidianus infernus*. Les cuves agitées préconisent seulement deux ou trois espèces dominantes de microorganismes. Cette technique est particulièrement dispendieuse, mais elle permet le contrôle des paramètres de l'extraction: pH, température, aération et vitesse de rotation. Aussi, cette technique est fortement recommandée pour l'extraction des métaux précieux ou en faible quantité comme l'or ou l'uranium.

La technique avec l'irrigation des dépôts de minerais ne se fait pas dans des cuves mais à l'air libre dans de vastes zones désertes. L'environnement des dépôts de minerais est plus hétérogène que dans les cuves agitées puisque les paramètres de culture sont moins contrôlés. Plusieurs dizaines d'espèces de microorganismes peuvent y vivre simultanément. Cette méthode est moins coûteuse, mais elle ne permet pas la meilleure récupération des métaux. C'est une technique utilisée pour les métaux de base comme le cuivre (Rawlings & Johnson, 2007).

Finalement, le problème d'acidité des eaux persiste toujours quand on exploite des bactéries capables d'oxyder le soufre. Par contre, une meilleure gestion de l'acidité est effectuée (par exemple par le pompage de l'acide généré dans les cuves dans un nouveau cycle d'extraction) ce qui réduit considérablement l'impact de ces eaux sur l'environnement.

1.5 Diminution du drainage minier acide

Il existe plusieurs méthodes capables d'arrêter la production des eaux acides (Johnson & Hallberg, 2005). L'inondation et le scellage des mines ainsi que le recouvrement des déchets des mines par une couche protectrice d'argile et l'enfouissement de ces résidus sont des techniques qui vont empêcher l'oxygène atmosphérique et l'eau d'être en contact avec les minéraux sulfurisés des mines. Le mélange des résidus miniers avec des produits chimiques contenant du phosphate peut aussi être utilisé. Ceux-ci pourront capter les ions ferriques et empêcher l'usage de leurs pouvoirs oxydants. Finalement, comme les microorganismes présents dans les mines jouent un rôle dans l'acidification des eaux, une méthode utilisant du SDS (*sodium dodecyl sulfate*) a été mise au point pour éliminer une grande partie de ces microorganismes. Toutefois, ces techniques ont leurs limitations ce qui ne garantit pas leurs succès à 100%. Le nettoyage des «déchets» miniers des différentes mines canadiennes coûterait entre deux à cinq milliards de dollars (*Environmental Mining Council of British Columbia*, 2000).

La minimisation de l'AMD devient donc un enjeu important pour la sécurité de l'environnement. Il existe deux approches différentes pour la réduction des drainages miniers acides : les techniques abiotiques et les techniques biologiques. Les techniques abiotiques utilisent des produits alcalins pour neutraliser le pH des eaux acides et pour faire précipiter les métaux. Ce sont des techniques relativement peu coûteuses, dépendamment des matériaux alcalins que les compagnies minières utilisent. Par contre, ces techniques doivent être utilisées continuellement puisque chaque substance chimique alcaline diffère par sa propre efficacité sur l'acidité. Les techniques biologiques utilisent un écosystème d'organismes, surtout des plantes, pour la production de substances alcalines et l'absorption des métaux lourds. Ces techniques

biologiques sont moins contrôlables et la composition des dépôts qu'il en résultent est incertaine (Johnson & Hallberg, 2005).

L'élimination et la minimisation des eaux acides, par des techniques chimiques ou biologiques, ne sont pas des techniques à 100% efficaces puisqu'elles sont limitées dans le temps et sont peu prévisibles. De plus, le site minier doit être adéquat pour ces traitements, ce qui n'est pas le cas sur plusieurs sites d'extractions minières.

1.6 Modèle du métabolisme du soufre

En tenant compte des lacunes de l'efficacité des techniques de remédiation du drainage minier acide, une meilleure compréhension du métabolisme du soufre chez les bactéries qui oxydent le soufre est nécessaire. En comprenant mieux leur métabolisme central il sera plus facile de déterminer les réactions qui contribuent à l'acidification des eaux minières et ainsi créer de nouvelles techniques de remédiation. Nous discutons ensuite des résultats basés sur l'analyse des génomes de bactéries du genre *Acidithiobacillus*: *A. ferrooxidans* (ATCC 23270 et ATCC 53993) (Valdés *et al.*, 2008; Quatrini *et al.*, 2009; Orellana *et al.*, 2011), *A. thiooxidans* (ATCC 19377 et A01) (Valdés *et al.*, 2011; Yin *et al.*, 2014) et *A. caldus* (ATCC 51756, SM-1 et MTH-04) (Valdes *et al.*, 2009; You *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012). Bien qu'*A. caldus* ne contribue pas aussi fortement aux dommages environnementaux que les deux autres microorganismes, son génome contient de précieuses informations sur l'oxydation du soufre.

1.6.1 *A. ferrooxidans*

Dans un premier temps, le modèle du métabolisme du soufre pour *A. ferrooxidans* ATCC 23270 est présenté en Figure 1.2. (Quatrini *et al.*, 2009). Tout d'abord, on remarque que la

majorité des réactions enzymatiques se produisent dans le périplasma, mais que quelques réactions enzymatiques se produisent aussi dans le cytoplasme. Selon ce modèle, il y a peu d'échange entre les réactions du périplasma et les réactions du cytoplasme. On note la présence de plusieurs composés réduits du soufre comme substrat ou produits d'enzymes, notamment, le sulfide (H_2S), le thiosulfate ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$), le tetrathionate ($\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$), le sulfane sulfate (GSSH), le sulfite (SO_3^{2-}) et l'adenosine 5'-phosphosulfate (APS^{2-}). Le produit final du cycle du soufre est le sulfate produit par l'ATP sulfurylase (SAT).

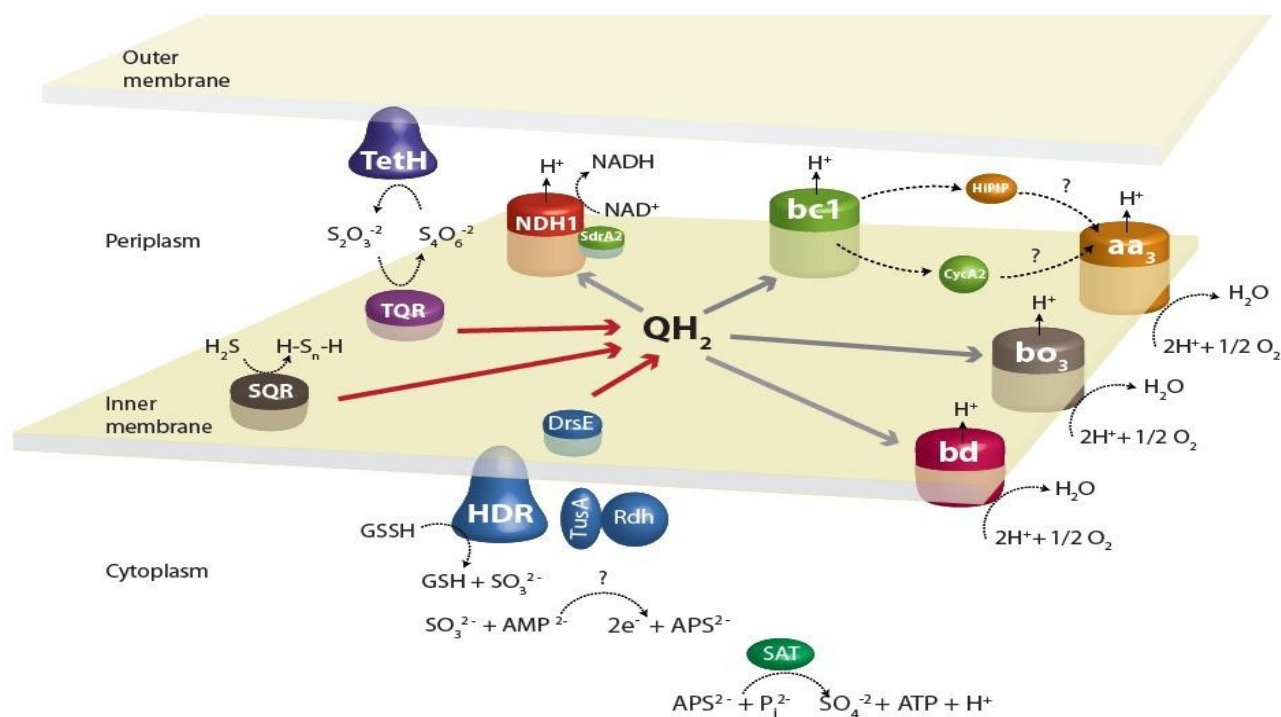


Figure 1.2. Modèle de l'oxydation du soufre chez *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Le soufre élémentaire du milieu est converti en sulfane sulfate (GSSH) et est amené vers la protéine heterodisulfide reductase (HDR) par les protéines de transfert de soufre. Les électrons du sulfane sulfate sont transférés vers une ubiquinone. Les électrons du sulfide, du thiosulfate ou du tétrathionate, se retrouvent transférés sur une ubiquinone. L'ubiquinone transfère les électrons vers les cytochromes bc1, aa₃, bc et bo₃ pour permettre la production de protons et la fabrication d'ATP. Les composants suivants jouent un rôle au métabolisme: tetrathionate reductase (TetH), sulfide quinone reductase (SQR), thiosulfate quinone reductase (TQR), complexe du cytochrome bc1, high potential iron-sulfur protein (HiPIP), cytochrome c (CycA2), NADH complexe I (NDH1), protéine accessoire du NADH complexe I (SdrA2), cytochromes bd et bo₃, cytochrome aa₃, heterodisulfide reductase (HDR), sulfur transferases (DsrE, TusA et Rhd), ATP sulfurylase (SAT) et ubiquinone (QH₂) (Quatrini *et al.*, 2009).

Les réactions d'oxydation et de réduction qui ont lieux au périplasma et au cytoplasme génèrent des électrons qui sont transférés vers les ubiquinones. Celles-ci les transfèrent aux cytochromes de la chaîne de transport des électrons pour générer un gradient de protons pour la production d'ATP via l'ATP synthase. Puisque le génôme d'*A. ferrooxidans* a été séquencé, il était possible d'identifier la presque totalité des enzymes impliqués dans le métabolisme du soufre, quoique certaines réactions demeurent encore inconnues (Quatrini *et al.*, 2009).

1.6.2 *A. caldus*

Dans un second temps, le génôme d'*A. caldus* MTH-04 a été séquencé et un modèle de son métabolisme du soufre est présenté en Figure 1.3. (Chen *et al.*, 2012). On peut remarquer une plus grande diversité de réactions enzymatiques comparé au métabolisme du soufre d'*A. ferrooxidans*. Presque toutes les réactions enzymatiques du métabolisme du soufre d'*A. caldus* sont connues. La majorité des réactions se produisent dans le périplasma, en ayant comme objectif final de créer de l'énergie par les électrons soustraits des composés du soufre. *A. caldus* possède deux cytochromes (bo₃ et bd) qui recueillent les électrons des ubiquinones centrales. On note particulièrement le complexe Sox (SoxA, B, X, Y, Z), qui métabolise le thiosulfate en énergie et en sulfate comme un élément distinctif d'*A. caldus*.

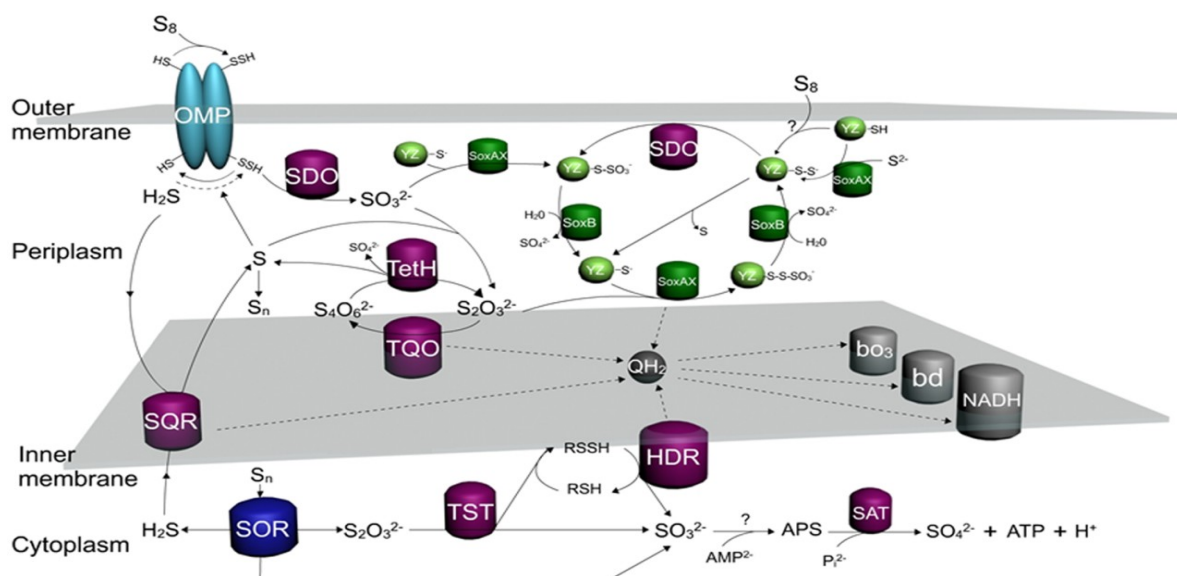


Figure 1.3. Modèle de l'oxydation du soufre chez *A. caldus* MTH-04. Le soufre élémentaire entre dans la bactérie par une *outer membrane protein* (OMP) et est converti en persulfide sulfur (S-SH). Il est ensuite métabolisé par l'enzyme SDO qui le converti en sulfite. Ceci mène à l'oxydation séquentielle des composés du soufre par les autres enzymes du cycle. Les électrons qui proviennent de l'oxydation du soufre sont dirigés vers des ubiquinones. Les ubiquinones transféreront leurs électrons vers la chaîne de transport des électrons pour créer un gradient protonique et ainsi produire de l'ATP. Les composants suivants jouent un rôle au métabolisme: *Outer membrane protein* (OMP), tetrathionate reductase (TetH), sulfide quinone reductase (SQR), Sox complex (SoxAX, SoxB, YZ), heterodisulfide reductase (HDR), ATP sulfurylase (SAT), ubiquinone (QH₂), sulfur dioxygenase (SDO), thiosulfate quinone oxidoreductase (TQO), sulfur oxygenase reductase (SOR), rhodanese (TST), NADH complexe I, cytochromes bd et bo3 (Chen *et al.*, 2012).

1.6.3 *A. thiooxidans*

Dans un troisième temps, le génôme d' *A. thiooxidans* A01 a été séquencé et un modèle de son métabolisme du soufre est présenté en Figure 1.4. (Yin *et al.*, 2014). Nous pouvons remarquer une très grande similarité entre son métabolisme et celui d'*A. caldus*. Toutefois, le séquençage de son génôme n'a pas été complété (Valdés *et al.*, 2011; Yin *et al.*, 2014), donc certaines informations métaboliques pourraient manquer. Aussi, peu de publications à son sujet sont disponibles, ce qui ne permet pas de déterminer les différentes réactions enzymatiques de son métabolisme, mais toutes les enzymes du métabolisme du soufre ont été répertoriées. D'un point de vue phylogénétique, ces trois microorganismes sont très similaires, ce qui permet de modéliser le métabolisme du soufre d'*A. thiooxidans*, même si le séquençage de son génôme n'était pas complet au début de nos travaux (Hedrich *et al.*, 2011; Jones *et al.*, 2014). Pour illustrer la divergence génomique entre *A. thiooxidans* et *A. caldus*, un arbre phylogénétique prenant en compte la séquence de l'enzyme sulfur oxygenase reductase (SOR) comme point de départ est présenté en Figure 1.5. (Yin *et al.*, 2014).

En résumé, en Figure 1.6., nous retrouvons les différentes enzymes du métabolisme du soufre dans les trois espèces bactériennes. Le nom de chaque enzyme ainsi qu'une indication de sa localisation cellulaire et de sa fonction chimique chez ces trois organismes s'y retrouve (Yin *et al.*, 2014).

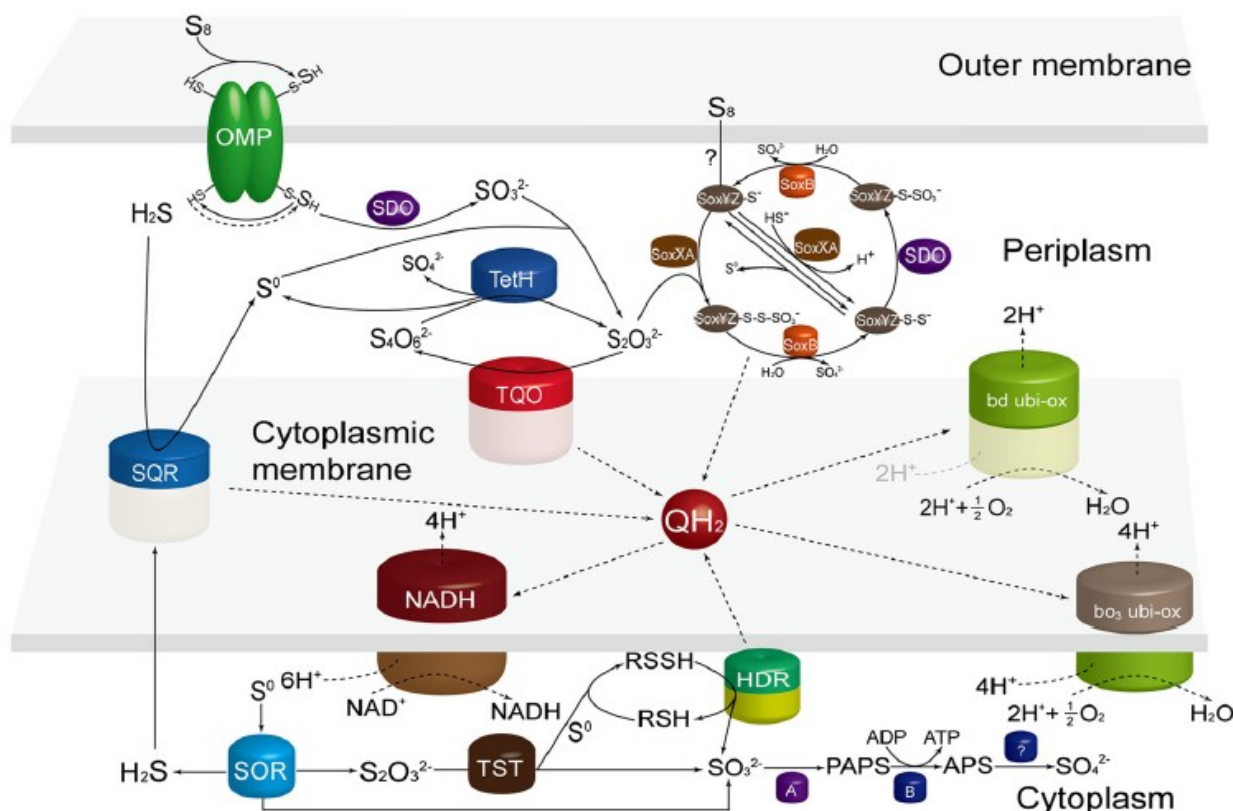


Figure 1.4. Modèle de l'oxydation du soufre chez *A. thiooxidans* A01. Le soufre élémentaire sous sa forme cyclique, S_8 , est métabolisé par la bactérie via le récepteur OMP et est converti en persulfide sulfur ($R-SH$). Puis, ce composé est transformé en sulfite et utilisé par l'enzyme TQO pour la formation de tétrathionate. Le tétrathionate est métabolisé en thiosulfate et le complexe Sox utilise le thiosulfate pour la production d'électrons envoyés vers les ubiquinones. De plus, l'oxydation continue des autres composés réduits du soufre par les autres enzymes du cycle produisent d'autres électrons qui sont envoyés vers les ubiquinones centrales. Les ubiquinones transfèrent leurs électrons vers la chaîne de transport des électrons pour créer un gradient protonique et ainsi produire de l'ATP. Finalement, la dismutation des différents composés du soufre produisent du sulfate, qui sert à produire de l'acide sulfurique. Les composants suivants jouent un rôle au métabolisme: sulfur dioxygenase (SDO); tetrathionate reductase (TetH); sulfide quinone reductase (SQR); thiosulfate:quinone oxidoreductase (TQO); sulfur oxidizing protein (Sox); heterodisulfide reductase (HDR); sulfur oxygenase reductase (SOR); thiosulfate sulfurtransferase (TST); phosphoadenosine phosphosulfate reductase (A); adenylylsulfate kinase (B); cytochromes bd et bo₃; ubiquinone (QH_2) (Yin *et al.*, 2014).

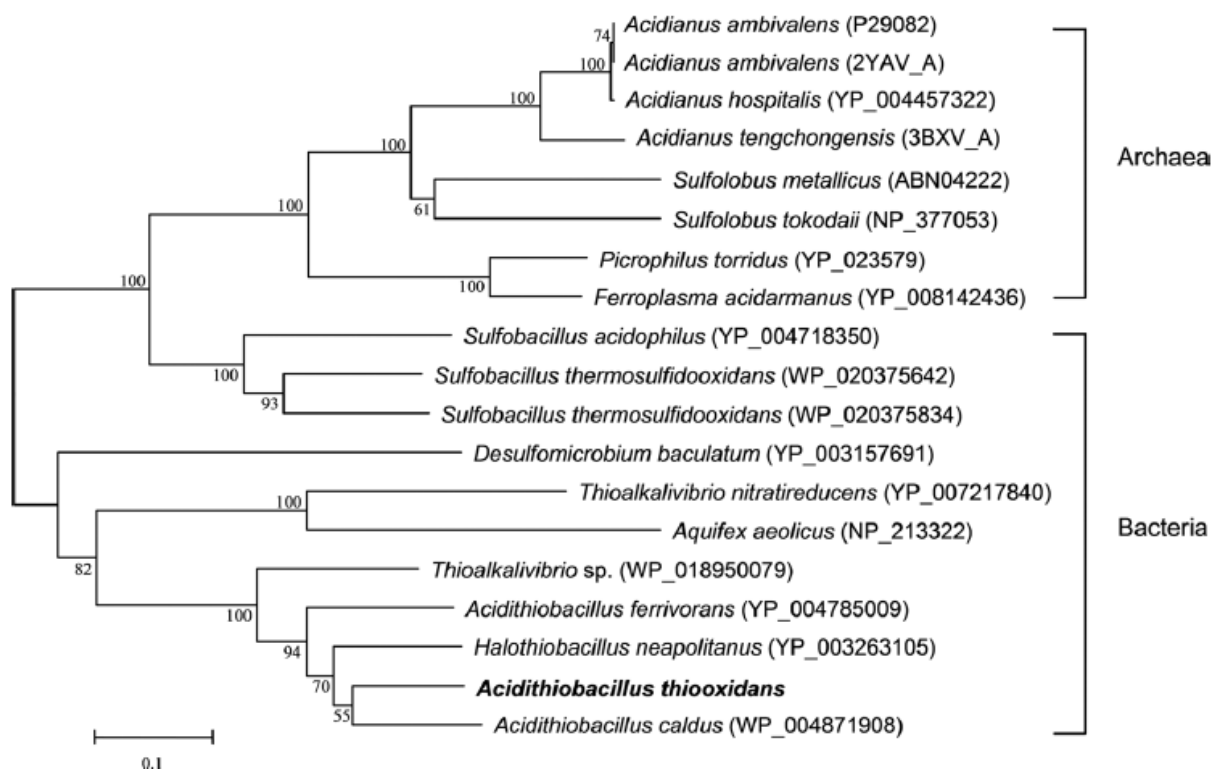


Figure 1.5. Arbre phylogénique basée sur les divergences des séquences protéiques de l'enzyme sulfur oxygenase reductase (SOR) de différentes espèces d'archées et de bactéries (Yin *et al.*, 2014). Les valeurs aux jonctions des branches de l'arbre représentent le pourcentage de *clustering* des séquences sur les branches. Plus la valeur est proche de 100, plus l'indication que les séquences sont proches au niveau de la séquence protéique est forte par rapport à toutes les autres séquences. La valeur de 0,1 de la légende (10%) représente le nombre de changements d'acide aminés par rapport à la longueur totale de la séquence de SOR. L'arbre a un *bootstrap* de 1000 répliqués.

Abbreviation	Enzyme name	No. of enzyme	Position	Reaction
SDO	Sulfur dioxygenase	EC 1.13.11.18	Periplasm	$S^0 \rightarrow SO_3^{2-}$
SQR	Sulfide quinone reductase	EC 1.8.5.4	Inner Membrane	$H_2S \rightarrow S^0$
TQO	Thiosulfate:quinone oxidoreductase	EC 1.8.5.2	Inner Membrane	$S_2O_3^{2-} \rightarrow S_4O_6^{2-}$
TetH	Tetrathionate hydrolase		Periplasm	$S_4O_6^{2-} \rightarrow S_2O_3^{2-} + SO_4^{2-} + S^0$
Sox	Sulfur oxidizing protein		Periplasm	$S_2O_3^{2-} \rightarrow SO_4^{2-} + S^0$
HDR	Heterodisulfide reductase		Cytoplasm	$RSSH \rightarrow RSH + SO_3^{2-}$
SOR	Sulfur oxygenase reductase	EC 1.13.11.55	Cytoplasm	$S^0 \rightarrow H_2S + SO_3^{2-} + S_2O_3^{2-}$
TST	Thiosulfate sulfurtransferase	EC 2.8.1.1	Cytoplasm	$S_2O_3^{2-} \rightarrow SO_3^{2-} + S^0$
PAPS reductase	Phosphoadenosine phosphosulfate reductase	EC 1.8.4.8	Cytoplasm	$SO_3^{2-} \rightarrow PAPS$
APS kinase	Adenylylsulfate kinase	EC 2.7.1.25	Cytoplasm	$PAPS \rightarrow APS$

Figure 1.6. Enzymes du métabolisme du soufre chez *A. ferrooxidans*, *A. caldus* et *A. thiooxidans*. Pour chaque enzyme, son abréviation, sa localisation cellulaire et sa réaction enzymatique est indiqué (Yin *et al.*, 2014). La plupart des enzymes se retrouvent dans les trois différentes espèces.

1.7 Similitudes et différences entre les différents métabolismes du soufre chez *A. ferrooxidans*, *A. caldus* et *A. thiooxidans*

Ces trois organismes possèdent les gènes qui codent pour les enzymes TetH, SQR, HDR et TQR (TQO). Ces enzymes effectuent probablement la même fonction dans les trois organismes. On peut aussi constater que les mêmes types de cytochromes sont présents dans les trois organismes et qu'ils utilisent probablement tous les ubiquinones comme récepteurs d'électrons.

Puisqu'ils ne sont pas capables de le métaboliser directement, ces microorganismes utilisent tous un composé réduit du soufre (S-SH) pour «activer» le soufre élémentaire à l'aide d'un récepteur membranaire afin de le faire entrer dans le périplasme. Le récepteur membranaire d'*A. ferrooxidans* n'est pas montré en Figure 1.2, mais il a été décrit dans une autre publication (Rohwerder & Sand, 2003).

Au niveau des différences, le complexe enzymatique Sox qui métabolise le thiosulfate en énergie est présent chez *A. caldus* et *A. thiooxidans*, mais ne se retrouve pas chez *A. ferrooxidans*. Nous remarquons aussi l'absence de l'enzyme thiosulfate sulfurtransferase (TST) et de l'enzyme sulfur oxygenase reductase (SOR) chez *A. caldus* contrairement au métabolisme d'*A. ferrooxidans* et d'*A. thiooxidans*. Ces enzymes assurent la conversion du thiosulfate cytoplasmique en sulfite et en soufre élémentaire; ce dernier étant utilisé par l'enzyme heterodisulfide reductase (HDR) pour la conversion du RSH en RSSH (GSH en GSSH pour *A. ferrooxidans*).

De plus, peu d'information est disponible concernant la conversion du sulfite et de l'AMP²⁻ vers la molécule APS²⁻ chez *A. ferrooxidans* et *A. caldus*. Les gènes codants pour la phosphoadenosine phosphosulfate reductase et l'adenylylsulfate kinase, présents dans le génôme

d'*A. thiooxidans*, servent à produire des enzymes qui catalysent la réaction du sulfite en APS. Cependant, ils ne sont pas répertoriés dans les génômes d'*A. ferrooxidans* et d'*A. caldus*, indiquant qu'elles utilisent probablement une autre voie de conversion (Quatrini *et al.*, 2009; Mangold *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012).

Aussi, ces bactéries ont une voie de métabolisation de sulfite et de production d'énergie, dans laquelle elles utilisent l'adénosine comme récepteur pour le soufre. Dans cette voie, la dernière réaction, qui consiste à utiliser l'APS par l'ATP sulfurylase (SAT) et de le convertir en sulfate, est probablement présente mais n'est pas connue chez *A. thiooxidans*.

Pour conclure, nous constatons que le métabolisme du soufre est complexe chez ces organismes. La complexité provient des multiples états d'oxydation du soufre qui peut adopter un niveau d'oxydation de -2 jusqu'à +6. Ceci complique l'identification des différentes fonctions des protéines puisque certaines enzymes produisent des molécules de plusieurs états d'oxydation. Il n'est donc pas toujours évident de suivre le déplacement des différentes espèces de soufre. De plus, certaines réactions se produisent spontanément, notamment le cas du sulfite qui se transforme rapidement en sulfate en contact avec l'oxygène et cela complique l'analyse (Valdés *et al.*, 2008).

1.8 Description du projet de recherche

En nous basant sur l'hypothèse selon laquelle la connaissance du métabolisme du soufre est incomplète chez les espèces du genre *Acidithiobacillus* et que ces espèces sont responsables de dommages environnementaux, une meilleure compréhension des activités enzymatiques est nécessaire pour gérer les mines d'une façon plus durable. Pour ce faire, nous avons utilisé la

souche bactérienne *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 19377 avec laquelle peu de recherches ont été effectuées jusqu'à présent.

Le projet de recherche est composé de trois objectifs principaux. Tout d'abord, le premier objectif a été de cultiver cette souche bactérienne en présence de soufre élémentaire ou de thiosulfate (Staley *et al.*, 1989), d'extraire son ADN génomique pour séquencer son génôme et d'assembler une version améliorée de celui-ci, par rapport aux versions partielles disponibles (Valdés J, 2011; Yin H, 2014). Ensuite, le deuxième objectif a été d'extraire son ARN total à différents points de croissance en présence de soufre élémentaire ou de thiosulfate, d'analyser le transcriptome de son métabolisme du soufre par rapport à différents niveaux d'acidité et dans des milieux de culture différents pour obtenir un portrait global de son activité métabolique et d'effectuer une analyse du reste du transcriptome pour apporter de nouvelles pistes d'exploration de l'adaptation métabolique. Finalement, le troisième objectif a été de corréler les données du transcriptome avec des données sur la biogéochimie du soufre et de la microscopie à électrons pour dresser un modèle complet de son métabolisme du soufre.

Chapitre 2

ARTICLE

2.1 Contribution des auteurs

Sous la supervision du Dr Christian Baron, Rodolfo Frazao a rédigé le protocole de recherche, cultivé la bactérie *Acidithiobacillus thiooxidans*, extrait son ARN total et effectué les analyses bio-informatiques. Dr Lesley Warren et David Camacho ont effectué les analyses sur la biogéochimie du soufre. Dr Nanci Antonio et Aurélien Fouillen ont préparé et visualisé les échantillons bactériens en microscopie électronique. Le groupe du Dr Lang a extrait l'ADN génomique, assemblé et annoté le génôme d'*A. thiooxidans*. Dr Christian Baron a aidé à la révision du manuscrit. Finalement, j'ai analysé et interprété toutes les données chimiques et biologiques obtenues.

Original Article

Title

An integrated transcriptomic and biogeochemical approach to analyze sulfur metabolism in *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 19377.

Running title

Sulfur metabolism of *Acidithiobacillus thiooxidans*.

Authors

Rodolfo Frazao¹, David Camacho², Aurélien Fouillen^{1,3}, Antonio Nanci^{1,3}, B. Franz Lang¹, Lesley Warren^{2,4} and Christian Baron¹

Affiliations

¹*Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, CAN;*

²*School of Geography and Earth Science, Faculty of Science, McMaster University, Hamilton, ON, CAN;*

³*Laboratory for the Study of Calcified Tissues and Biomaterials, Faculty of Dentistry, Université de Montréal, Montréal, QC, CAN;*

⁴*Department of Civil and Mineral Engineering, Faculty of Applied Science and Engineering, University of Toronto, Toronto, ON, CAN;*

Correspondence

Christian Baron

Université de Montréal, Pavillon Roger Gaudry, Department of Biochemistry and Molecular medicine, C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, QC, H3C 3J7, Canada,

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Subject Categories

Integrated genomics and post-genomics approaches in microbial ecology.

2.2 Abstract

Acidithiobacillus thiooxidans is an autotrophic acidophilic bacterium that contributes to the development of acid mine drainage (AMD) in mine tailings. Remediation of AMD requires costly chemical interventions, and a better comprehension of acid generation via the sulfur metabolism of *A. thiooxidans* is required for management of this process. We cultivated *A. thiooxidans* on elemental sulfur and on thiosulfate media and analyzed its sulfur metabolism at different growth stages using a combination of genome sequencing, high-throughput RNA sequencing (RNA-Seq), sulfur biogeochemistry and electron microscopy. Our results demonstrate that the Sox complex coding genes were expressed in both culture media, but expression was downregulated during growth on sulfur when the pH-value dropped from 2.5 to 1.5. Similarly, genes encoding flagellar components were upregulated at pH 2.5 suggesting higher mobility of metabolically more active cells. In contrast, the expression of heterodisulfide reductase increased at pH 1.5 as compared to 2.5 during growth on sulfur, indicating a metabolic shift towards the end of the growth phase at the low pH-value. The Sox complex genes were highly expressed during growth on thiosulfate indicating a predominating contribution to energy metabolism. The tetrathionate hydrolase gene was highly expressed only on thiosulfate, showing that cells grown on the two energy sources have quite distinct metabolic signatures. Biogeochemical analysis of sulfur species showed the production of sulfate and of sulfur oxidation intermediates during growth on sulfur and the disproportionation during growth on thiosulfate, which is in accord with the distinct metabolic profiles. Finally, using electron microscopy we detected higher amounts of sulfur globules in the cytoplasm of *A. thiooxidans* grown on sulfur as compared to thiosulfate, providing additional insights into the dynamic changes of sulfur metabolism depending on the growth medium and growth phase.

2.3 Introduction

Acidithiobacillus thiooxidans is a Gram-negative chemolithotrophic acidophilic gamma-proteobacterium that lives in mine tailings and in rocks containing sulfur compounds. It uses reduction equivalents from elemental sulfur and reduced inorganic sulfur compounds (RISCs) to generate energy, and fixes atmospheric CO₂ using the Calvin cycle [1]. It is an obligate autotrophic bacterium that cannot use organic carbon as a source of energy and it is well adapted to low pH values. Two related species of the same genus are similar, *A. ferrooxidans* and *A. caldus* both run on RISCs as their primary source of energy. *A. ferrooxidans* can also oxidate ferrous iron (Fe²⁺) to gather energy and is capable of using ferric iron (Fe³⁺) as an alternative source of electron acceptors [2, 3]. In contrast, *A. caldus* thrives at high temperatures (40-50°C) and is not capable of using iron as a source of energy [4-7].

A. thiooxidans is important for the mining industry due to its ability to produce a high level of acidity needed to separate the high value ore from the rocks (bioleaching). Yet, it contributes to acid mine drainage (AMD), which is the result of acid generation via the sulfur metabolism of *A. thiooxidans* and related species [8-11]. Around the world, the mining industry faces the challenge of acidic tailings that threaten the safety of water sources and soil in the mine perimeter. Acidic tailings are generally being treated with large amounts of clay, the addition of basic compounds to neutralize acidity, or by submerging the tailings with water [12]. Most of these solutions require constant follow-up to ensure the safety of the environment around the mine. A better comprehension of the timing of the biogeochemical reactions in the tailings would enable new approaches for the detection and management of acidic tailings.

The reactions in the tailings are due to various biogeochemical cycles, such as the sulfur cycle, which contributes to acid generation [13]. The sulfur cycle is driven by the multiple oxidation states of this element ranging from +2 to -6; *A. thiooxidans* can utilize multiple oxidation states of sulfur for example to generate energy [14]. Sulfur metabolism is very complex since in addition to the enzyme-catalyzed reactions there are abiotic reactions producing sulfur oxidation intermediates (SOI) [14]. In recent years, high-throughput genome sequencing and quantitative PCR analysis have led to a better comprehension of *A. thiooxidans*' sulfur metabolism [8, 14]. Many genes encoding enzymes of sulfur metabolism were found and annotated in the genomes of *Acidithiobacillus* species, such as sulfide quinone reductase (SQR), thiosulfate:quinone oxidoreductase (TQO), tetrathionate hydrolase (TetH) and the sulfur oxidizing protein complex Sox (SoxAX, SoxB, SoxXY). However, it is difficult to obtain a complete picture of sulfur metabolism due to the disproportionation of sulfur compounds during enzymatic reactions and due to the contribution of abiotic reactions [8, 14]. Here we have used a combination of genome sequencing, high-throughput RNA sequencing, biogeochemistry and electron microscopy in order to obtain integrated information on the sulfur metabolism of *Acidithiobacillus*.

First, using Illumina paired-end and mate-pair data, we substantially improved the genome assembly of *A. thiooxidans* ATCC 19377 compared to previous work [15]. Second, using RNA-Seq, we analyzed gene expression at the whole-genome level to analyze the expression of sulfur metabolism enzymes and to identify other genes that may contribute to this pathway. Third, we correlated the results of RNA-Seq to those from biogeochemical analysis of sulfur species in the growth medium. Lastly, electron microscopy was used to investigate

intracellular sulfur globules that also contribute to sulfur metabolism, providing an integrated picture of sulfur metabolism in this organism.

2.4 Materials & methods

Culture conditions

Cells were grown in liquid elemental sulfur or thiosulfate media [1]. The media contained two components, the salt medium and the sulfur source. Elemental sulfur salt medium: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2g; $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 0.5g; $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 0.331g; KH_2PO_4 , 3.0g; $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 9.15 mg; distilled water, 1000 ml. The salt medium was sterilized by passing through a 0.22 μm filter. Elemental sulfur powder (Sulfur, Powder/USP, Fisher Scientific) was incubated in an oven at 100°C for 30 minutes and the cycle was repeated three times. The salt medium was then added to the culture flasks and the final sulfur concentration was 1%. Thiosulfate medium: salt medium as above and $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ was added at 0.2%, followed by filter sterilization (0.22 μm filter). For both cultures, the total volume of medium corresponded to a fifth of the total volume of the Erlenmeyer flask. All cultures were initially inoculated at 5% v/v with cultures pre-grown in the corresponding media; the inoculant bacteria were washed with sterile 1% NaCl solution prior to inoculation. All cultures were grown under aerobic conditions at 30°C and flasks were shaken at 120 rpm.

Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

Cells were harvested at the desired time points and washed with 1% NaCl. For the growth curves, 2 μl of the Live/Dead marker mixture of component A and component B at a ratio of 1:1 (L7012 LIVE/DEAD® BacLight, Bacterial Viability Kit, ThermoFisher Scientific) were added to 1.5 ml of bacterial suspension. The rationale behind the Live/Dead stain is that all cells will be stained green, because SYTO 9 penetrates into live and dead cells and stains their DNA, whereas propidium iodide (red stain) penetrates only into dead or damaged cells with leaky membranes

staining their DNA. For the negative control (dead cells), the cells were first washed with 1% NaCl and then incubated in 70% ethanol for one hour, followed by washing with 1% NaCl. Propidium iodide (Component B) was added (0.66 μ l for 1 ml of bacterial suspension). For the positive control, 0.66 μ l of SYTO 9 (Component A) was added to 1 ml of bacterial suspension. All samples were incubated in the dark at room temperature for 15 minutes, followed by cell counting in a FACS BD Canto II instrument. The excitation/emission maxima for SYTO 9 are 480/500 nm and 490/635 nm for propidium iodide. Experiments were conducted in triplicate.

DNA purification

Genomic DNA was purified from cells from 50 ml bacterial culture grown on elemental sulfur by manual cell disruption with a pestle in the presence of small glass beads (< 106 μ m diameter; sufficient to form a thick paste). Genomic DNA was purified from combined washes with TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) following the instructions of the Qiagen Genomic G20 kit, resulting in 10 μ g of purified total DNA.

Illumina DNA sequencing

For paired-end Illumina sequencing (MISEQ-PE300, i.e. 300 nucleotides read length), a TruSeq library was constructed with sized DNA fragments (570 to 650 bp). The reads received from the sequencing service (McGill and Genome Quebec Innovation Centre; Montreal) were cleaned from adapters and quality-clipped with Trimmomatic software [16], resulting in a total of 2,254,174 read pairs. In addition, a Nextera mate-pair library (insert size 7-8 kbp) was sequenced on two flow cells of Illumina HISEQ (rapid mode; 150 nt read length), and cleaned with Trimmomatic (8,224,769 read pairs).

Genome assembly and annotation

Sequence reads were cleaned with Trimmomatic [16], random sequencing error corrected with Rcorrector [17], and the genome was assembled with Spades v. 3.6.1 [18] using a coverage cutoff value of 3.0. The resulting set of contigs was annotated with Prokka v.1.1.1 [19].

Total RNA extraction

Cells were harvested at specific time points and washed with ice-cold 1% NaCl. They were then lysed and total RNA was extracted using the High Pure RNA Isolation Kit (Roche). Instead of 4 µl of lysozyme as indicated in the kit, 20 µl were added to efficiently break the cells. The lysozyme solution was prepared from egg white lysozyme (Bio Basic Inc; activity: 20 000 U/mg) at a final concentration of 50 mg/ml. The genomic DNA was removed using the TURBO DNA-free™ kit (Ambion). The concentration of total RNA was determined using a Nanodrop instrument and the quality of the preparation was assessed by agarose gel electrophoresis to monitor 16S and 23S ribosomal RNA. Samples were conserved at -80°C; experiments were conducted in triplicate.

High-throughput RNA sequencing and bioinformatics

Sequencing was done using Illumina Hi-seq technology (100 bases in paired-end). Quality controls, DNA library construction from isolated RNA and sequencing were performed at the Génome Québec Innovation Centre (Montréal, Canada). Reads quality control, fragments mapping and differential expression on genes were performed using softwares available on the Galaxy server (<https://usegalaxy.org/>) [20-22]. Full-length reads (100 bases) were trimmed so that only portion 11 to 80 of each read was conserved to ensure an average read quality above

30. Quality control of the reads was done using FastQC (Galaxy Tool Version 0.63) before and after trimming. The quality format was changed to "Sanger & Illumina 1.8+" using FASTQ Groomer (Galaxy Tool Version 1.0.4). Reads were mapped as paired-end using Tophat (Galaxy Tool Version 0.9). The mean inner distance between mate pairs was set to 150 bases and the standard deviation to 20. Our own assembly was used as guide to help align the reads and the defaults parameters of Tophat were selected. Finally, differential expression was analysed using Cufflinks (Galaxy Tool Version 2.2.1.0). The "max intron length" was set to 300,000, the "min isoform fraction" was set to 0.1 and the "pre mRNA fraction" to 0.15. Cufflinks only counted fragments compatible with the reference annotation of the genome and it performed a biased correction using the genome assembly. Default Cufflinks parameters were selected.

Biogeochemical analysis

Nine sterile 1L flasks were prepared for cultivation: six containing salt medium with elemental sulfur and three with thiosulfate culture medium, followed by inoculation as described above. Elemental sulfur cultures were sampled on days 0, 1, 2, 3, 4 and 5; thiosulfate cultures were sampled on days 0, 2 and 4 and for each sampling point, medium from one flask was used. The parameters sampled were pH, $\sum S_{aq}$ (total aqueous/dissolved sulfur), SO_4^{2-} , S^{2-} , $S_2O_3^{2-}$, S^0 and SO_3^{2-} . The pH was measured both using paper strips (Fisherbrand™) and an electronic pH meter (Denver Instrument 225). Sulfur species were measured by: $\sum S_{aq}$ via ICP-AES; SO_4^{2-} and S^{2-} via spectrophotometry and $S_2O_3^{2-}$, S^0 and SO_3^{2-} via HPLC.

ΣS_{aq} – determination by ICP-AES

40 ml of sample was filtered through a 0.45 μm filter and 80 μl ultra-pure nitric acid was added immediately to the filtrate. Samples were stored at 4°C until measured. $\Sigma S_{(aq)}$ concentrations were determined by inductively coupled argon plasma emission spectrometry (ICP-AES) (Varian730 ES, Mulgrave, VIC). Sulfur calibration standards were prepared from certified reference stock solutions (AccuStandard New Haven, CT, USA) in 2 % v/v HNO_3 . The sulfur concentration was determined by taking the average of the results obtained from signal intensity measurements made at the sulfur 181.972 and sulfur 180.669 nm emission lines. The limit of detection (LOD) for sulfur was 1 mg L^{-1} (calculated as three times the standard deviation of the mean for the blank). The quality control/quality assurance included duplicate analysis and drift analysis on at least 10 % of samples.

SO_4^{2-} and S^{2-} - determination by spectrophotometry

Samples were taken immediately after harvesting and analyzed using the HACH SulfaVer 4 Method and Methylene Blue Method for SO_4^{2-} and S^{2-} , respectively.

$S_2O_3^{2-}$, S^0 and SO_3^{2-} - determination by HPLC

Sampling and preservation were accomplished using a monobromobimane derivitization procedure for S intermediates for HPLC [23]. The Alltima HP C18 (5 μm x 150mm x 4.6mm) reverse phase column and Shimadzu LC-20AD prominence HPLC instrument were used for all analyses. Solvents used in protocols were: A=water, B=methanol, C=acetonitrile, D=acetic acid 0.25% v/v pH 3.5 adjusted with NaOH (1 N). $S_2O_3^{2-}$ and SO_3^{2-} were assessed via fluorescence excitation at 380 nm and emission at 480 nm, respectively. Standards and calibrations for $S_2O_3^{2-}$

(0-10 mM) and SO_3^{2-} (0-1.7 mM) were made with sodium thiosulfate and sodium sulfite, respectively. The thiosulfate and sulfite elution protocol was as follows: 0-1min, 1ml/min flow; 1-6 min, 1 ml/min to 0.85 ml/min flow linear gradient; 0-8 min B 35%, D 65% to B 40%, D 60% linear gradient, oven heated to 35°C. Sample size was 5 μl and elution times were 3 min for sulfite and 6.5 min for thiosulfate, respectively. S^0 was extracted with chloroform from both filtered (0.45 μm , i.e aqueous) and unfiltered samples and analyzed with reverse-phase HPLC and UV-absorption at 263 nm. Standards and calibrations (0-32 mM) were made from elemental sulfur dissolved in chloroform. Elemental S elution protocol: 1 ml/min isocratic flow, B 65%, C 35%; the sample size was 10 μl and the elution time was at 5 min.

Transmission electron microscopic analysis

Twenty-five ml cultures of bacteria were grown in 1% elemental sulfur or 0.2% thiosulfate media, respectively. Cells were sedimented and rinsed three times with 0.1 M phosphate buffer at pH 7.2 (2.76 g NaH_2PO_4 with 100 ml H_2O : solution A, 14.2 g Na_2HPO_4 with 500 ml H_2O : solution B; mix 95 ml of solution A with 405 ml of solution B; adjust pH to 7.2) to eliminate the remaining medium. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde (Acros organics, Morris Plains, N.J., USA) and 0.1% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, Pa., USA) for 30 min at 4°C, followed by osmification using 1% osmium tetroxide for 1 h at room temperature. Between the fixing step and the osmification step, the pellets were washed three times with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2). The pellets were dehydrated using alcohol washes and then processed for embedding in paraffin. Ultrathin sections of 80–100 nm thickness were cut with a diamond knife and collected on formvar-carbon coated 200-mesh nickel grids. Sections were then stained with 2% uranyl acetate and examined using a FEI Tecnai

12 (Eindhoven, The Netherlands) transmission electron microscope equipped with a LaB6 filament and operated at an acceleration voltage of 80 kV.

EDS and WDS Analysis

Bacterial sections were imaged using a transmission electron microscope (Jeol JEM-2100F, JEOL Ltd, Tokyo, Japan) equipped for elemental analysis using energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS). In addition, a scanning electron microscope (Jeol JSM-7600F, JEOL Ltd, Tokyo, Japan) was used for wavelength dispersive X-ray spectroscopy (WDS) to isolate the X-rays of interest for quantitative analysis.

2.5 Results

Growth of *Acidithiobacillus thiooxidans* in elemental sulfur and thiosulfate media

As a first step towards the characterization of metabolic adaptation, we analyzed the growth of *A. thiooxidans* in media with two different energy sources (elemental sulfur or thiosulfate). The concentration of sulfur in both media is different due to the optimal growth of *A. thiooxidans*. For elemental sulfur growth, the optimal concentration is 1% of sulfur while it is only 0.2% on thiosulfate growth. A different concentration would have resulted in a slow growth or a no growth of *A. thiooxidans* (data not shown).

Since elemental sulfur and sulfur oxidation intermediates (SOI) create turbidity in the medium, the measurement of cell growth by measurement optical density is not reliable. We therefore established a fluorescence-activated cell sorting (FACS)-based assay that reliably quantifies the growth of the cells as well as their viability (Fig. 1; supplementary Fig.1). Bacteria multiply exponentially on elemental sulfur and thiosulfate medium right after inoculation and both cultures reach a plateau at day five of cultivation. The pH value stabilizes at 1.5 (elemental sulfur) and 2.5 (thiosulfate), respectively, and viability decreases after prolonged cultivation (supplementary Fig.1).

Sequencing, assembly and annotation of the *A. thiooxidans* genome

One key objective of our work was to correlate the results of the analysis of sulfur species in the medium with the expression of the sulfur metabolism genes in *A. thiooxidans* using RNA-seq. To this end, we needed a more robust genome sequence than the available draft version [15]. The published draft genome sequence has 164 contigs at low coverage, which may lead to incomplete transcriptome analyses. For this reason we re-sequenced the genome of *A.*

thiooxidans ATCC 19377 grown on elemental sulfur. Table I shows the characteristics of the assembly comprising 20 contigs and a total of 3,406,445 bp, including three plasmid sequences. Another set of 40 small contigs (size range between 128 – 5259 bp) carry polymorphic sites that are not counted in the total genome size. While we did not complete the genome assembly due to multiple repeat regions and polymorphism within the ATCC isolate (which is not clonal as this bacterium cannot be grown on agar dishes), the quality of assembly was greatly improved over the published GenBank record. In fact, a significantly larger fraction of RNA-seq reads aligned to our new genome assembly (see below and supplementary Table I). Gene annotation identified all genes encoding enzymes of sulfur metabolism such as *sqr* (sulfide quinone reductase), the sox (sulfur oxidation) complex (*soxA*, *soxB*, *soxX*, *soxY* and *soxZ*), *aps* (ATP sulfurylase), *rhd* (rhodanese), the heterodisulfide reductase (*hdrA*, *hdrB* and *hdrC*), *tetH* (tetrathionate hydrolase), *doxD* (thiosulphate:quinone oxidoreductase), *sor* (sulfur oxygenase reductase), *paps* (phosphoadenosine phosphosulfate reductase) and *sdo* (sulfur dioxygenase). All these genes have been previously identified in other *Acidithiobacillus* species [2-7], with full support of the new genome assembly. The genome contains two operons encoding the Sox complex, three copies of *hdrA*, two copies of *rhd* and three copies of *sdo*. The plasmids apparently do not code for genes that are of interest in this context, with the potential exception of a gene for a “divalent metal cation transporter” (MntH), which may have been recruited via a plasmid to deal with high metal ion concentrations in its natural environment.

Expression analysis of the sulfur metabolism genes using RNA-seq

For transcriptome analysis, we collected total RNA from cultures of *A. thiooxidans* grown on elemental sulfur and on thiosulfate media in order to compare gene expression on two

sulfur substrates that have different reduction states. To monitor different growth phases we collected RNA when the culture reached pH 2.5 (day 3) and pH 1.5 (day 5) on elemental sulfur, and at pH 2.5 (day 5) on thiosulfate media. To assess the quality of mapping of the RNA-seq sequences on the genome assembly, we compared the percentage of concordant pair alignments using the same raw RNA-seq data and the two genomes (new assembly and the draft genome [15]). We observed an increase of more than 30% of the total concordant pair alignments of the RNA-seq data for the newly assembled genome for each individual sample as compared to the draft (supplementary Table S1). These data underline the quality of the new genome assembly that was used for all the following analyses.

RNA-seq analysis is a whole genome approach allowing the detection of low and highly expressed genes using the parameter fragments per kilobase of transcript per million mapped reads (FPKM) and we compared the results from the three analyzed samples (elemental sulfur pH 1.5 & pH 2.5 and thiosulfate pH 2.5). Table II shows a direct comparison of the FPKM values and Figure 2 shows pair-wise comparisons of data using heat maps (Figure 2A and 2C) and relative (\log_2) expression levels (Figure 2B and 2D). FPKM values under 100 are interpreted as low to no expression, as compared to the highly expressed genes with FPKM values in the thousands [24]. This analysis revealed that some genes like *sqr* are highly expressed in all three conditions at comparable levels suggesting that the gene product sulfide quinone reductase plays an important role for metabolism. Other genes are relatively weakly expressed, and whereas there is some variation of gene expression, it is difficult to assess whether they provide major contributions to sulfur metabolism under these conditions (*aps*, *doxD*, *sor* and *paps*). In the case of *sdo*, encoding sulfur dioxygenase required for the entry of elemental sulfur

into the cell, one gene copy is modestly expressed under all conditions, whereas two gene copies are weakly expressed under all conditions.

The genes encoding the Sox complex (*soxA*, *B*, *X*, *Y*, *Z*) are highly expressed under all conditions, but the relative expression of the two *sox* operons changes during growth on elemental sulfur at pH 2.5 (day 3) and pH 1.5 (day 5; *sox-1* decreases and *sox-2* increases). In contrast the *sox-1* operon is very highly expressed during growth on S_2O_3 and the *sox-2* operon is also strongly expressed showing the importance of the gene products under these conditions. We also observed high expression for the *rhd* and *hdrA*, *hdrB*, *hdrC* genes under all conditions, but *hdrA-1* and *hdrA-2* expression strongly increases at pH 1.5 as compared to pH 2.5 during growth on sulfur, suggesting an increased importance of the gene product in this growth phase. In contrast, the tetrathionate hydrolase encoding gene (*tetH*) is highly expressed only during growth on thiosulfate, showing that it plays a special role during growth on this substrate.

Genome wide analysis of gene expression

While the analysis of sulfur metabolism genes is vital to the full comprehension of *A. thiooxidans* metabolism, analysis of the rest of its transcriptome could lead to identification of other interesting genes correlated with metabolic adaptation. To this effect, we conducted pairwise comparisons of relative gene expression levels (FPKM) in order to identify up- and down-regulated genes that may play key roles in metabolic adaptation.

Analysis of gene expression after growth on elemental sulfur at pH 2.5 compared to pH 1.5 (Figure 3A), showed that 20% of the genes (660) are upregulated and 12% (404) are downregulated. The top 50 upregulated genes showing the highest degree of differential expression (\log_2 of FPKM) are presented in supplementary Table S2 and a large number of these

genes encode chemotaxis and flagellar components. We also analyzed the top 50 downregulated genes, but no clear signature emerged since most encode hypothetical proteins (supplementary Table S3).

Analysis of gene expression after growth on elemental sulfur at pH 2.5 compared to thiosulfate pH 2.5 (Figure 3B), showed that 18% of the genes (594) were upregulated and 8% (269) were downregulated. The top 50 upregulated genes showing the highest degree of differential expression (\log_2 of FPKM) are presented in supplementary Table S4 and some of these genes encode to chemotaxis components as well as ATP synthase genes components. Analysis of the top 50 downregulated genes found hypothetical proteins as well as transcription factors involved in osmoregulation and cytochrome C biogenesis (supplementary Table S5).

Finally, analysis of gene expression after growth on thiosulfate at pH 2.5 compared to elemental sulfur at pH 1.5 (Figure 3C) showed that 8% of the total genes were upregulated (271) and 11% were downregulated (347). The top 50 upregulated genes are listed in supplementary Table S6 and some of these genes encode components of cytochrome C biogenesis and of proteins involved in protein folding and outer membrane stability. Analysis of the top 50 downregulated genes did not lead to a clear signature since most encode hypothetical proteins (supplementary Table S7). The analysis of gene expression on a genome-wide scale revealed additional details on metabolic adaptation.

Geochemical analysis of sulfur intermediates

We analyzed the sulfur metabolites in the media (S^0 , S^{2-} , SO_3^{2-} , $S_2O_3^{2-}$, SO_4^{2-} and not defined sulfur oxidation intermediates, SOI) next in order to correlate the patterns of gene expression with the products of sulfur metabolism and with acid generation (Figure 4,

supplementary Table S8 and supplementary Table S9). We observed an increase of the production of sulfate and of SOI as well as negligible amounts of sulfide and of sulfite in both conditions. After growth on sulfur for 5 days (pH drops to 1.5), we detected primarily non-aqueous elemental sulfur that was probably not metabolized (Figure 4A). Analysis of the aqueous forms of sulfur showed rapid production of the metabolic end product sulfate and a marked increase of production of SOI beginning at pH 3.3, leading to equal amounts of sulfate and SOI at the end point 1.5 (Figure 4B). During growth on thiosulfate medium we observed a rapid decline of the substrate and the production of sulfate, of SOI as well as of non-aqueous elemental sulfur as well as acidification of the medium (Figure 4C and D). The results support the notion that *A. thiooxidans* uses the substrates for the generation of energy leading to production the end product sulfate. However, the production of SOI under both conditions and of non-aqueous elemental sulfur during growth on thiosulfate suggests that metabolic cycling as well as disproportionation reactions act in parallel. Reactions of sulfur metabolism are known to generate elemental sulfur and we next analyzed the subcellular localization of this metabolite [8].

Detection of internal sulfur globules by transmission electron microscopy

Some sulfur-metabolizing bacteria are known to accumulate elemental sulfur in the cells [25, 26] and we used transmission electron microscopy (TEM) to analyze this possibility in *A. thiooxidans* grown in sulfur and on thiosulfate medium. We observed distinct round-shaped intracellular inclusions in both cases and the number of globules was 4-fold higher after growth on elemental sulfur than after growth on thiosulfate (32% of the cells after growth on elemental sulfur had at least one sulfur globule compared to only 8% for the cells after growth on thiosulfate; n=100) (Figure 5A). Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) was used to

determine the elemental composition of the globules. This approach revealed a significant sulfur-specific spike, indicating the presence of sulfur in the observed area where globules are present in cells grown under both conditions (Figure 5B and 5C). Because the sulfur spike is close to the lead spike using EDS and because the embedded samples contain lead, wavelength dispersive spectroscopy (WDS) coupled with scanning electron microscopy were used to distinguish the two spikes. Using this approach we detected a distinct signal for the sulphur in cells grown under both conditions (Figure 5D). As negative control, regions of bacteria that do not contain a globule were analyzed showing that the globules indeed contain sulfur (supplementary Figure 2).

2.6 Discussion

A. thiooxidans is a metabolically specialized bacterium that can only utilize sulfur compounds as its source of energy for autotrophic growth. The end product of the oxidation is sulfate that is secreted outside the cell leading to acidification and to AMD in mine tailings. Similar to previous publications [8, 14] we observed substantial growth on elemental sulfur as well as on thiosulfate as sole energy source, but adaptation to the media proceeded more quickly on thiosulfate. The apparent lack of a lag phase indicated that soluble thiosulfate was more accessible in the medium than the elemental sulfur that is an insoluble substrate. In contrast, growth on sulfur led to stronger acidification (final pH of 1.5 vs 2.5), which is probably due to the fact that sulfur (oxidation state 0) is a much richer source of reduction equivalents (energy source) as compared to thiosulfate as indicated by their delta G formation values (elemental sulfur is 19 kcal/mol and thiosulfate is -124.90 kcal/mol) [27]. This notion is also supported by the analysis of intracellular sulfur globules that may represent storage of excessive energy source and that are much more abundant in cells grown on sulfur as compared to thiosulfate. The presence of intracellular sulfur is also an indication of the fact that metabolism does not proceed in a unidirectional fashion from the substrates to the ultimate product sulfate. In fact, the geochemical analysis of sulfur species in the media showed the production of significant amounts of SOI of unknown composition and the production of sulfur as well as sulfate indicated disproportionation during growth on thiosulfate, which is similar to observations in previous work [28, 29].

In order to understand the details of the sulfur metabolism pathway under both conditions, we conducted RNA-seq analysis representing a quantifiable approach to analyze gene expression [24]. The analysis of the expression of genes encoding enzymes of sulfur metabolism provided important insights into distinct metabolic patterns of cells grown with sulfur or

thiosulfate as energy source. Whereas we cannot exclude that the products of genes that are weakly expressed (FKPM values below 100) provide an important contribution to metabolism, it is more likely that the enzymes encoded by strongly expressed genes are associated with the predominant contributions to metabolism. The three *sdo* genes were modestly expressed under all conditions, but it is likely that the gene product sulfur dioxygenase provides an important contribution enabling the cell to activate elemental sulphur after uptake into the cell. The *sqr* gene encoding sulphide quinone reductase is highly expressed under all conditions indicating an important contribution to the oxidation of sulphide, which is a product of the disproportionation of sulphur by the sulphur oxygenase reductase, to cell metabolism while transferring electrons to the quinone pool.

We also obtained evidence for metabolic shifts at different points of growth on sulfur (pH 2.5 at day 3 and pH 1.5 at day 5). The products of the Sox complex are strongly expressed under both conditions suggesting that they make an important contribution to energy production. Interestingly, the expression of the *sox-1* operon strongly decreased between days 3 and 5 of growth on sulfur, whereas the expression of the *sox-2* operon increased. The reason for this change is not clear, but it may reflect an adaptation to the low pH value at the transition from exponential growth to the stationary phase. In contrast, the expression of *hdrA* was markedly increased at day 5 as compared to day 3 that could be linked to the recycling of cytoplasmic thiol proteins by heterodisulfide reductase under conditions under which rhodanese produces sulfur that could also enter cytoplasmic storage vesicles.

The comparison between the gene expression on elemental sulfur and on thiosulfate reveals a very distinct pattern. Both *sox* operons are highly expressed on thiosulfate, but *sox-1* expression is significantly higher than during growth on sulfur, indicating that energy generation

via the Sox complex is predominating under these conditions. Also, the *tetH* gene is strongly expressed, whereas its expression is weak during growth on sulfur. This indicates that the metabolic role of the gene product tetrathionate hydrolase is crucial under these conditions; by interconversion between tetrathionate, thiosulfate and sulfate, it could contribute to the disproportionation of sulfur species observed in the media.

Whereas we primarily focused on the genes involved in sulfur metabolism, RNA-seq analysis provides genome-wide quantitative information on gene expression patterns. This analysis revealed higher expression of a substantial number of genes of the flagellar assembly pathway at pH 3 during growth on sulfur as compared to day 5 in the same medium. The bacteria are probably more metabolically active in the exponential growth phase at day 3 and this could be linked to higher mobility. We also obtained evidence for differential expression of genes encoding ATP synthase components as well as genes encoding components of the cytochrome C biogenesis, protein folding and membrane stability, providing additional insights into the distinct metabolic adaptations under the different growth conditions tested here.

By providing real-time quantitative and partly dynamic data, the results from this study provide a substantial advance as compared to previously published work that was mainly based on genome analysis and simulations [8, 14]. Our work will thereby help decipher the contributions of different enzymes of the sulfur pathway to bacterial metabolism under different conditions. The information on differentially expressed genes is highly pertinent for the mining industry, since sustainable and low cost remediation and prevention techniques for the AMD problem are needed [11, 12]. The identification of differentially expressed genes provides a promising avenue towards prediction and management of AMD and to this end it will be necessary to analyze the dynamics of gene expression under a wider variety of pertinent growth

conditions. This will involve the analysis of gene expression in more complex growth media as well as the inclusion of other species of bacteria as in a natural ecosystem. Given that the genomes of many pertinent bacteria are now available, genomics-based approaches have big potential to have an important impact in the future. Finally, with the emergence of genetic tools for some *Acidithiobacillus* species, it is now feasible to analyze the effect of gene deletions, thereby testing the contributions of specific enzymes to sulphur metabolism [30]. The integrated approach chosen here combining molecular biology as well as geochemical analysis will serve as a model for integrated approaches in future.

2.7 Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the technical support by Benoit Bessette and by Serge Sénéchal (Université de Montréal, Department of Microbiology, Infectiology and Immunology) for FACS analysis.

2.8 References

1. Staley JT, Bryant MP, Pfennig N, Holt JG: **Acidithiobacillus**. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol 3*. Edited by Wilkins Wa, vol. 3, 1st edn. Baltimore; 1989: 1842-1858.
2. Valdes J, Pedroso I, Quatrini R, Dodson RJ, Tettelin H, Blake R, 2nd, Eisen JA, Holmes DS: **Acidithiobacillus ferrooxidans metabolism: from genome sequence to industrial applications**. *BMC Genomics* 2008, **9**:597.
3. Quatrini R, Appia-Ayme C, Denis Y, Jedlicki E, Holmes DS, Bonnefoy V: **Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme acidophile Acidithiobacillus ferrooxidans**. *BMC Genomics* 2009, **10**:394.
4. Valdes J, Quatrini R, Hallberg K, Dopson M, Valenzuela PD, Holmes DS: **Draft genome sequence of the extremely acidophilic bacterium Acidithiobacillus caldus ATCC 51756 reveals metabolic versatility in the genus Acidithiobacillus**. *J Bacteriol* 2009, **191**(18):5877-5878.
5. Mangold S, Valdes J, Holmes DS, Dopson M: **Sulfur metabolism in the extreme acidophile acidithiobacillus caldus**. *Front Microbiol* 2011, **2**:17.

6. You XY, Guo X, Zheng HJ, Zhang MJ, Liu LJ, Zhu YQ, Zhu B, Wang SY, Zhao GP, Poetsch A *et al*: **Unraveling the *Acidithiobacillus caldus* complete genome and its central metabolisms for carbon assimilation.** *Journal of Genetics and Genomics* 2011, **38**(6):243-252.
7. Rzhepishevskaya OI, Valdes J, Marcinkeviciene L, Gallardo CA, Meskys R, Bonnefoy V, Holmes DS, Dopson M: **Regulation of a novel *Acidithiobacillus caldus* gene cluster involved in metabolism of reduced inorganic sulfur compounds.** *Applied and Environmental Microbiology* 2007, **73**(22):7367-7372.
8. Yin H, Zhang X, Li X, He Z, Liang Y, Guo X, Hu Q, Xiao Y, Cong J, Ma L *et al*: **Whole-genome sequencing reveals novel insights into sulfur oxidation in the extremophile *Acidithiobacillus thiooxidans*.** *BMC Microbiol* 2014, **14**:179.
9. Rawlings DE, Johnson DB: **The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia.** *Microbiology* 2007, **153**(Pt 2):315-324.
10. Ko MS, Park HS, Kim KW, Lee JU: **The role of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in arsenic bioleaching from soil.** *Environmental Geochemistry and Health* 2013, **35**(6):727-733.

11. Johnson DB, Hallberg KB: **The microbiology of acidic mine waters.** *Research in Microbiology* 2003, **154**(7):466-473.
12. Johnson DB, Hallberg KB: **Acid mine drainage remediation options: a review.** *The Science of the Total Environment* 2005, **338**(1-2):3-14.
13. Dopson M, Johnson DB: **Biodiversity, metabolism and applications of acidophilic sulfur-metabolizing microorganisms.** *Environmental Microbiology* 2012, **14**(10):2620-2631.
14. Bobadilla Fazzini RA, Cortes MP, Padilla L, Maturana D, Budinich M, Maass A, Parada P: **Stoichiometric modeling of oxidation of reduced inorganic sulfur compounds (Riscs) in Acidithiobacillus thiooxidans.** *Biotechnology and Bioengineering* 2013, **110**(8):2242-2251.
15. Valdes J, Ossandon F, Quatrini R, Dopson M, Holmes DS: **Draft genome sequence of the extremely acidophilic biomining bacterium Acidithiobacillus thiooxidans ATCC 19377 provides insights into the evolution of the Acidithiobacillus genus.** *J Bacteriol* 2011, **193**(24):7003-7004.
16. Bolger AM, Lohse M, Usadel B: **Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data.** *Bioinformatics* 2014, **30**(15):2114-2120.

17. Song L, Florea L. **Rcorrector: efficient and accurate error correction for Illumina RNA-seq reads.** *Gigascience* 2015, **19**(4):48.

18. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD *et al*: **SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing.** *Journal of Computational Biology : a Journal of Computational Molecular Cell Biology* 2012, **19**(5):455-477.

19. Seemann T: **Prokka: rapid prokaryotic genome annotation.** *Bioinformatics* 2014, **30**(14):2068-2069.

20. Goecks J, Nekrutenko A, Taylor J, Galaxy T: **Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences.** *Genome Biology* 2010, **11**(8):R86.

21. Giardine B, Riemer C, Hardison RC, Burhans R, Elnitski L, Shah P, Zhang Y, Blankenberg D, Albert I, Taylor J *et al*: **Galaxy: a platform for interactive large-scale genome analysis.** *Genome Res* 2005, **15**(10):1451-1455.

22. Blankenberg D, Von Kuster G, Coraor N, Ananda G, Lazarus R, Mangan M, Nekrutenko A, Taylor J: **Galaxy: a web-based genome analysis tool for experimentalists.** *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M Ausubel [et al]* 2010, **Chapter 19**:Unit 19 10 11-21.

23. Rethmeier J, Rabenstein A, Langer M, Fischer U: **Detection of traces of oxidized and reduced sulfur compounds in small samples by combination of different high-performance liquid chromatography methods.** *Journal of Chromatography A* 1997, **760**(2).
24. Mader U, Nicolas P, Richard H, Bessieres P, Aymerich S: **Comprehensive identification and quantification of microbial transcriptomes by genome-wide unbiased methods.** *Current Opinion in Biotechnology* 2011, **22**(1):32-41.
25. Weissgerber T, Zigann R, Bruce D, Chang YJ, Detter JC, Han C, Hauser L, Jeffries CD, Land M, Munk AC *et al*: **Complete genome sequence of *Allochromatium vinosum* DSM 180(T).** *Standards in Genomic Sciences* 2011, **5**(3):311-330.
26. Holkenbrink C, Barbas SO, Møllerup A, Otaki H, Frigaard NU: **Sulfur globule oxidation in green sulfur bacteria is dependent on the dissimilatory sulfite reductase system.** *Microbiology* 2011, **157**(Pt 4):1229-1239.
27. Oelkers E, Helgeson H, Shock E, Sverjensky D, Johnson J, Pokrovskii V: **Summary of the apparent standard partial molar gibbs free energies of formation of aqueous species, minerals, and gases at pressures 1 to 5000 bars and temperatures 25 to 1000 °C.** *J. Phys. Chem. Ref. Data* 1995, **24**(4).

28. Bernier L, Warren LA: **Geochemical diversity in S processes mediated by culture-adapted and environmental enrichments of *Acidithiobacillus* spp.** *Geochim Cosmochim Acta* 2007, **71**:5579-5846.
29. Warren LA, Norlund KL, Bernier L: **Microbial thiosulphate reaction arrays: the interactive roles of Fe(III), O₂ and microbial strain on disproportionation and oxidation pathways.** *Geobiology* 2008, **6**(5):461-470.
30. Chen L, Ren Y, Lin J, Liu X, Pang X, Lin J: ***Acidithiobacillus caldus* sulfur oxidation model based on transcriptome analysis between the wild type and sulfur oxygenase reductase defective mutant.** *PLoS One* 2012, **7**(9):e39470.

2.9 Legends to figures

Figure 1. Growth curves of *A. thiooxidans* ATCC 19377. Cells were cultivated on media with different energy sources and the pH values of the media were determined as well as the numbers of viable cells (by FACS). **A.** Growth on elemental sulfur medium. **B.** Growth on thiosulfate medium. Error bars represent the standard deviation; experiments were conducted in triplicates.

Figure 2. Relative expression of the sulfur metabolism genes. RNA-seq analysis was conducted to quantify the levels of transcripts of genes known to be involved in sulphur metabolism in *A. thiooxidans* grown in sulfur media (to pH 2.5 and 1.5) and in thiosulfate media (to pH 2.5). The relative gene expression levels were compared in pair-wise combinations to a control dataset. **A.** Heat map to compare gene expression after growth in sulfur (pH 2.5) and thiosulfate (pH 2.5) to that on sulfur (pH 1.5) as control. Values higher than 0 represents upregulation and values lower than 0 represent downregulation; values are represented in fold change (log2). **B.** Representation of relative gene expression as in A presented as a column graph. Error bars represent the standard deviation; experiments were conducted in triplicates. * p-value below 0.05 and ** p-value below 0.01. **C.** Heat map to compare gene expression after growth in sulfur (pH 1.5 and pH 2.5) to that on thiosulfate (pH 2.5) as control. Values higher than 0 represents upregulation and values lower than 0 represent downregulation; values are represented in fold change (log2). **D.** Representation of relative gene expression as in C presented as a column graph. Error bars represent the standard deviation; experiments were conducted in triplicates. * p-value below 0.05 and ** p-value below 0.01. **D.** Representation of the relative expression of the sulfur metabolism, same as C, but as a column graph. Error bars

represent the standard deviation, experiments were conducted in triplicates. * p-value below 0.05 and ** p-value below 0.01.

Figure 3. Representation of upregulated and downregulated genes in the *A. thiooxidans* genome after growth on elemental sulfur or thiosulfate. RNA-seq analysis was conducted to quantify the levels of transcripts in the *A. thiooxidans* genome grown in sulfur media (to pH 2.5 and 1.5) and in thiosulfate media (to pH 2.5). The relative expression levels of 3300 genes were analysed and compared in a pair-wise fashion. **A.** Percentage of upregulated and downregulated genes after growth on elemental sulfur to pH 2.5 as compared to elemental sulfur pH 1.5; **B.** as in A compared to thiosulfate pH 2.5 **C.** Percentage of upregulated and downregulated genes after growth on thiosulfate to pH 2.5 compared to growth on elemental sulfur pH 1.5. Upregulated genes: \log_2 value ≥ 1 . Downregulated genes: \log_2 value ≤ -1 . No change: \log_2 value $> -1 < 1$.

Figure 4. Biogeochemical analysis of the sulfur species in the media during growth of *A. thiooxidans* ATCC 19377 on elemental sulfur or thiosulfate. Bacteria were cultivated until the indicated pH values were reached, followed by the quantitative analysis of sulphur species (S^0 , S^{2-} , SO_3^{2-} , $S_2O_3^{2-}$, SO_4^{2-} , SOI) in the media. **A.** Total sulfur species during growth on sulfur. **B.** Total aqueous sulfur during growth on sulfur. **C.** Total sulfur species during growth on thiosulfate. **D.** Total aqueous sulfur during growth on thiosulfate. SOI: Sulfur oxidation intermediates.

Figure 5. Transmission electron microscopy (TEM) showing sulfur globules inside *A. thiooxidans* ATCC 19377. *A. thiooxidans* was grown in sulfur media (to pH 1.5) and in thiosulfate media (to pH 2.5). **A.** Negative staining micrograph on bacterial slices at 6,500-fold magnification. **B.** Inset of A at 21,000-fold magnification to show sulphur globules. **C.** Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) of the micrograph in B using TEM. The red square shows the spike position corresponding to sulfur. **D.** Wavelength dispersive spectroscopy (WDS) coupled with scanning electron microscopy (SEM) separating the sulfur spike (red square) from the lead spike.

2.10 Tables

Table I. Assembly and annotation of the *Acidithiobacillus thiooxidans* genome ATCC 19377.

Characteristic	Value
Total number of contigs (including 3 plasmids)	20
Largest contig (total genome size)	2,390,832 bp (3,406,445 bp)
Average % GC	52.6
Number of tRNA genes	63
Number of rRNA genes	4
Total number of coding sequences	3505
Number of proteins with known function	2242
Number of hypothetical proteins	1263

Table II. Average FPKM values showing expression of genes from the sulfur metabolism pathway under different growth conditions.

Gene	Elemental sulfur pH 1.5	Elemental sulfur pH 2.5	Thiosulfate pH 2.5
<i>sqr</i>	3353.37	4622.97	3123.52
<i>soxA-1</i>	739.91	8990.54	27740.75
<i>soxB-1</i>	505.93	6620.00	18732.00
<i>soxX-1</i>	1431.49	13321.25	48107.60
<i>soxY-1</i>	1886.54	18028.85	58197.45
<i>soxZ-1</i>	2138.15	20502.85	63385.80
<i>soxA-2</i>	969.58	136.50	1445.42
<i>soxB-2</i>	1358.27	453.00	3489.10
<i>soxX-2</i>	775.68	126.47	1306.67
<i>soxY-2</i>	1552.24	596.96	4122.40
<i>soxZ-2</i>	1763.89	723.08	5214.72
<i>aps</i>	67.69	177.50	81.82
<i>rhd-1</i>	838.71	755.95	915.57
<i>rhd-2</i>	660.77	1345.13	701.90
<i>hdrA-1</i>	11963.53	8667.69	8235.72
<i>hdrA-2</i>	26.78	50.35	20.14
<i>hdrA-3</i>	19040.90	4627.82	15624.63
<i>hdrB</i>	1354.04	1175.53	831.10
<i>hdrC</i>	6564.70	4902.92	4219.44
<i>tetH</i>	213.89	251.45	5968.47
<i>doxD</i>	39.15	41.84	53.56
<i>sor</i>	16.93	21.39	26.02
<i>paps</i>	80.04	20.40	147.92
<i>sdo-1</i>	65.14	82.02	56.59
<i>sdo-2</i>	265.24	335.58	296.68
<i>sdo-3</i>	39.95	122.44	34.38

2.11 Figures

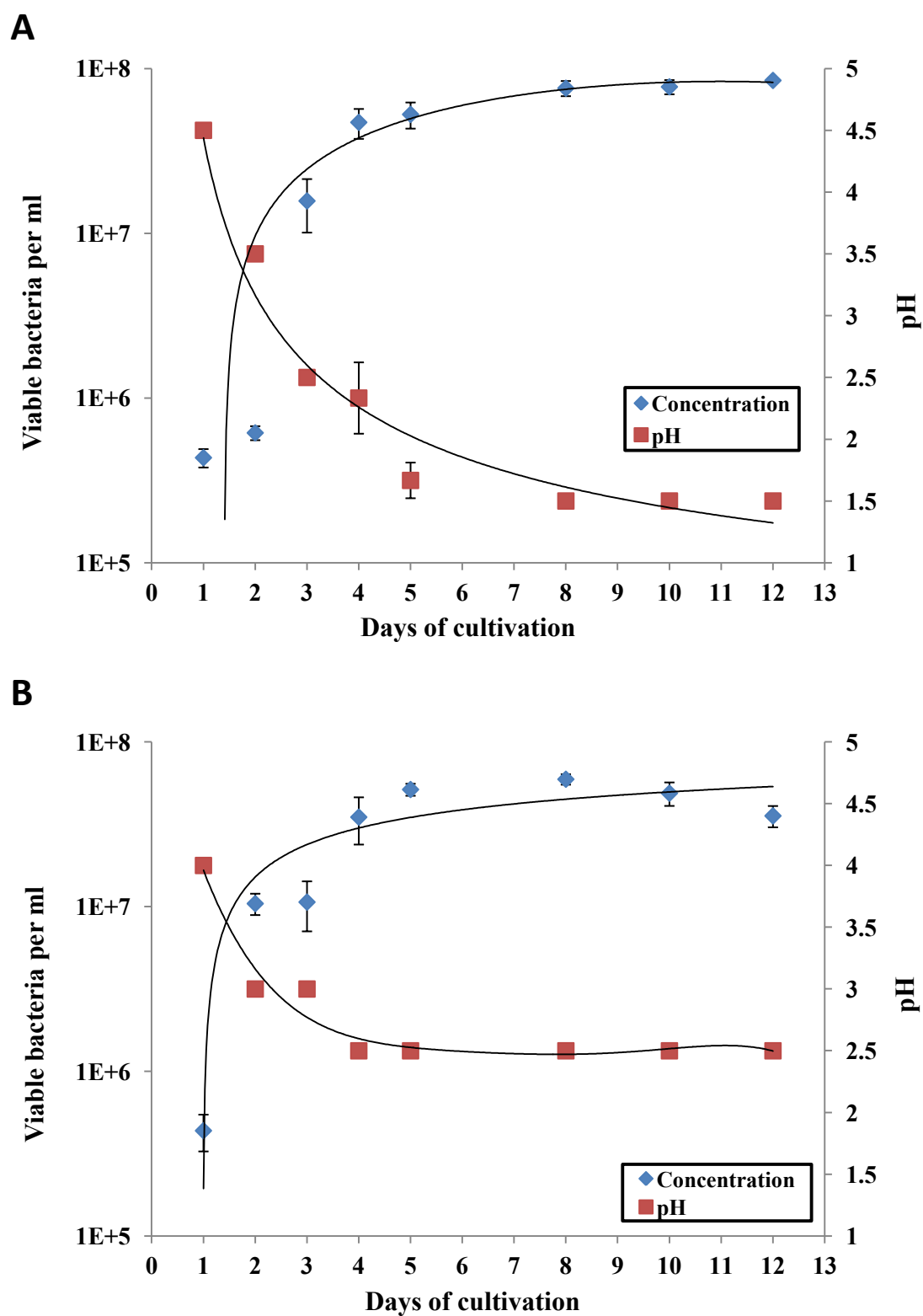
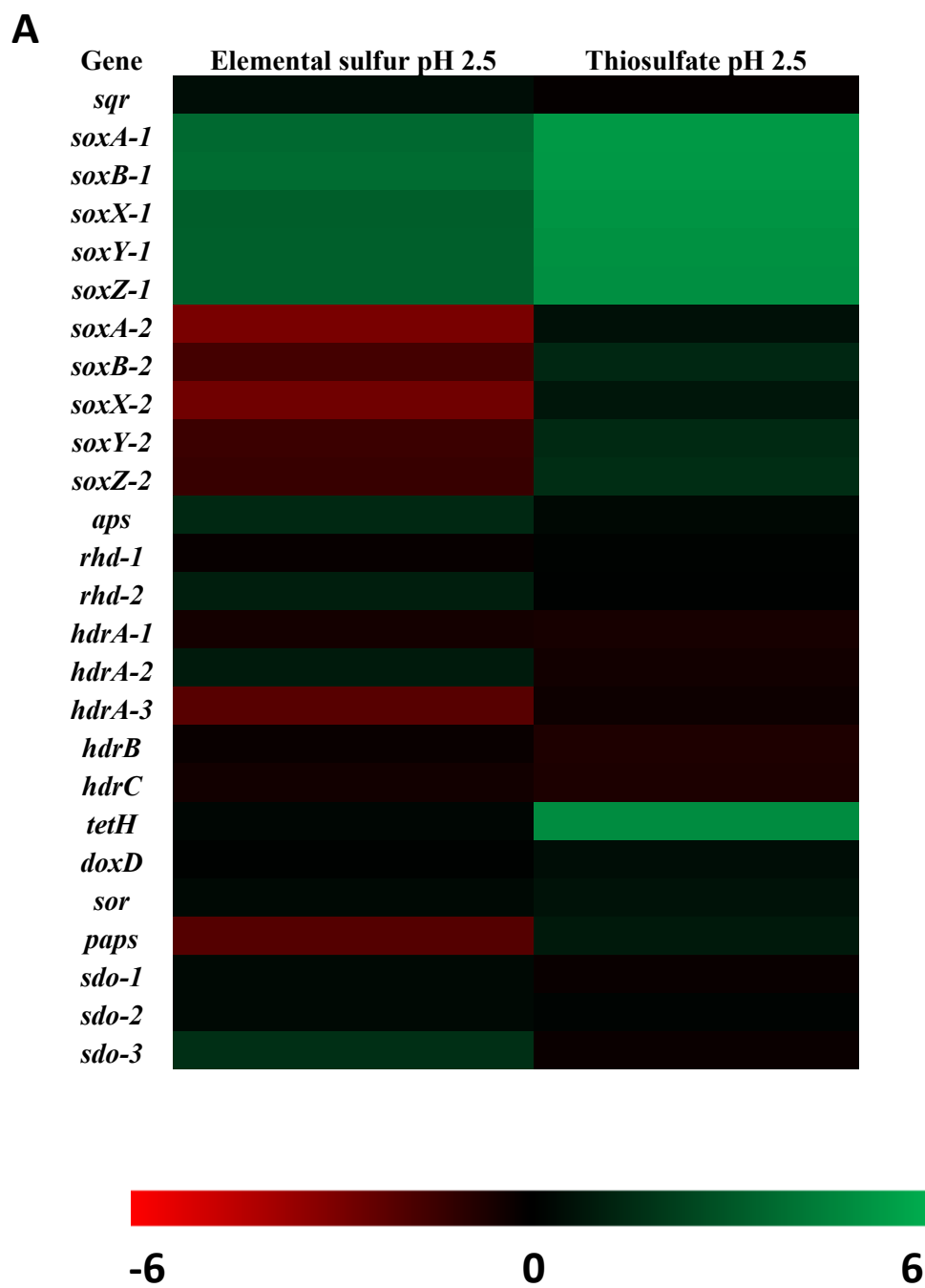
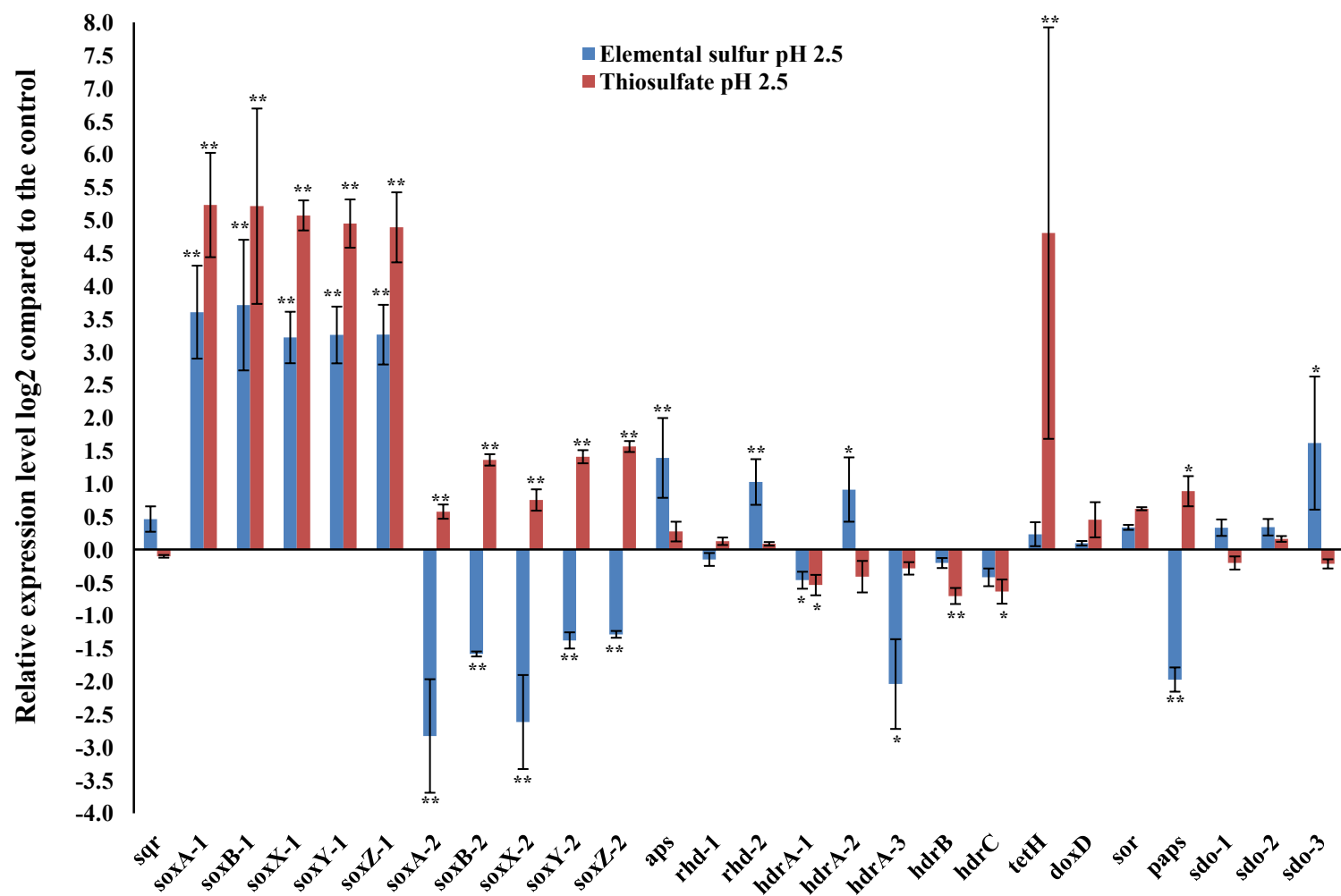
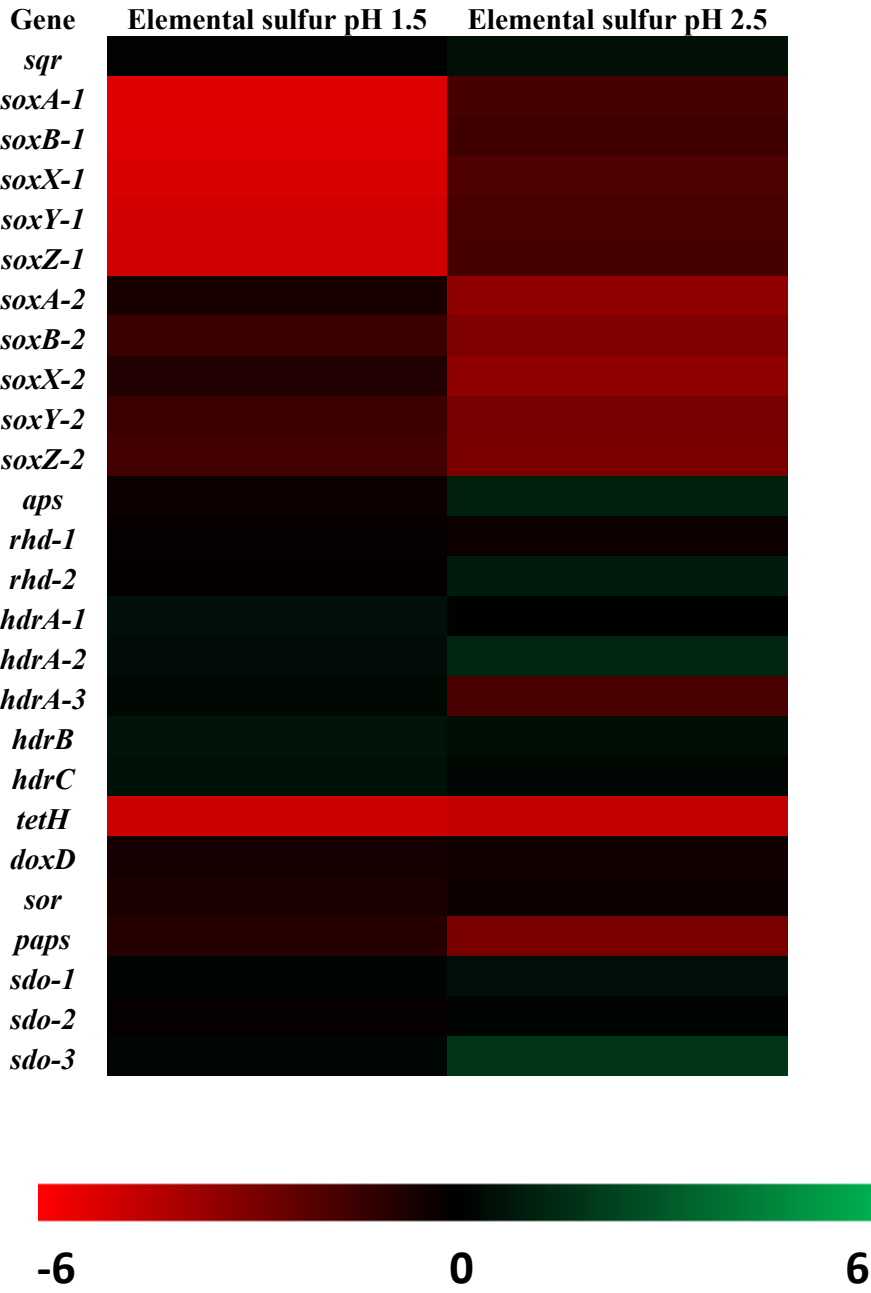
FIGURE 1

FIGURE 2



B

C



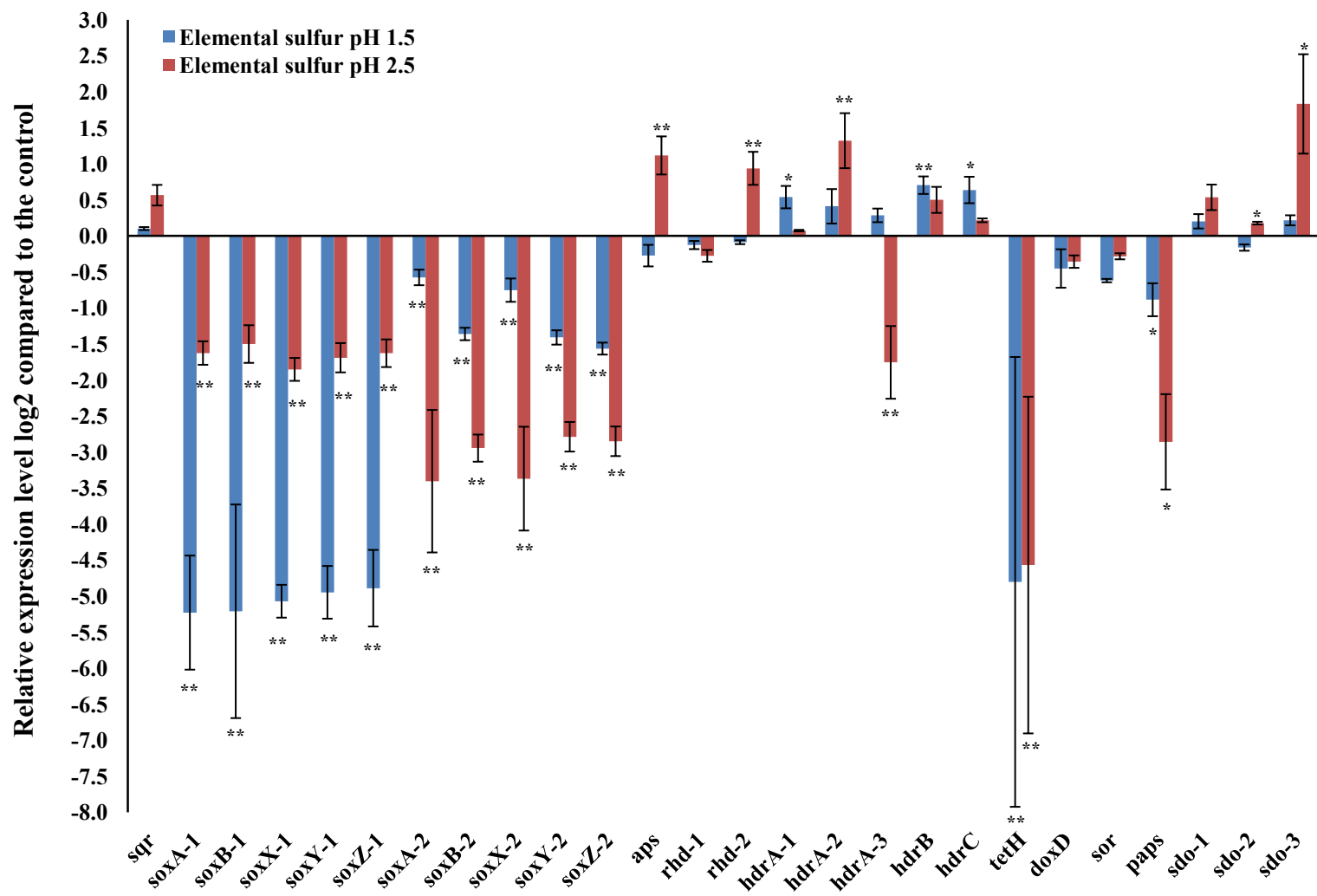
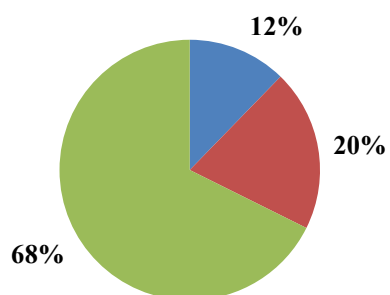
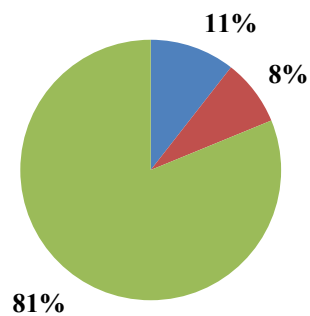
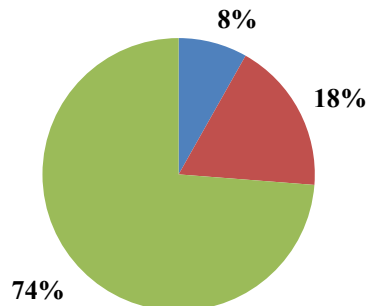
D

FIGURE 3**Elemental sulfur pH 2.5 compared to elemental sulfur pH 1.5****Thiosulfate pH 2.5 compared to elemental sulfur pH 1.5****Elemental sulfur pH 2.5 compared to thiosulfate pH 2.5**

Upregulated genes	■
Downregulated genes	■
No change	■

FIGURE 4

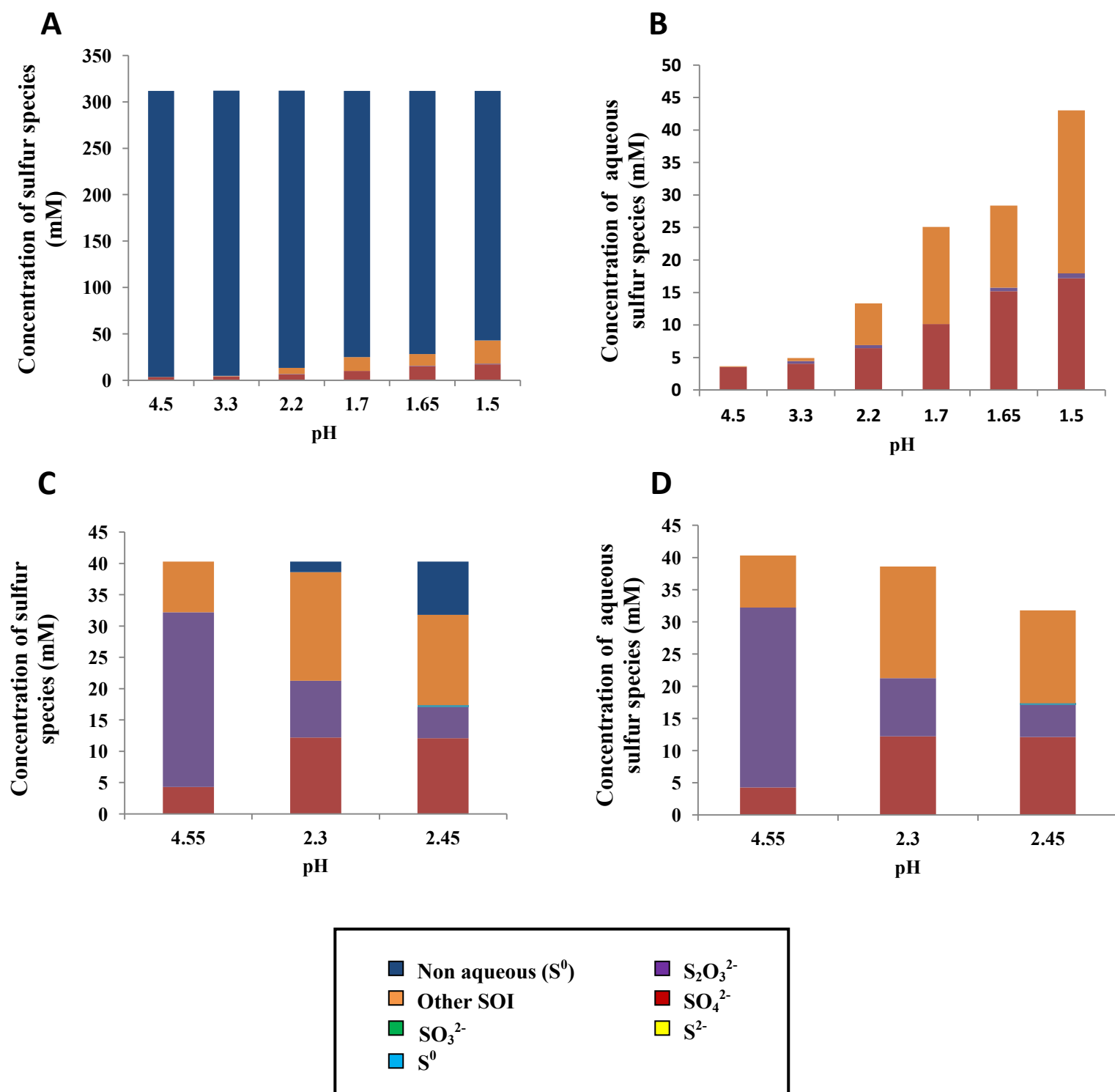
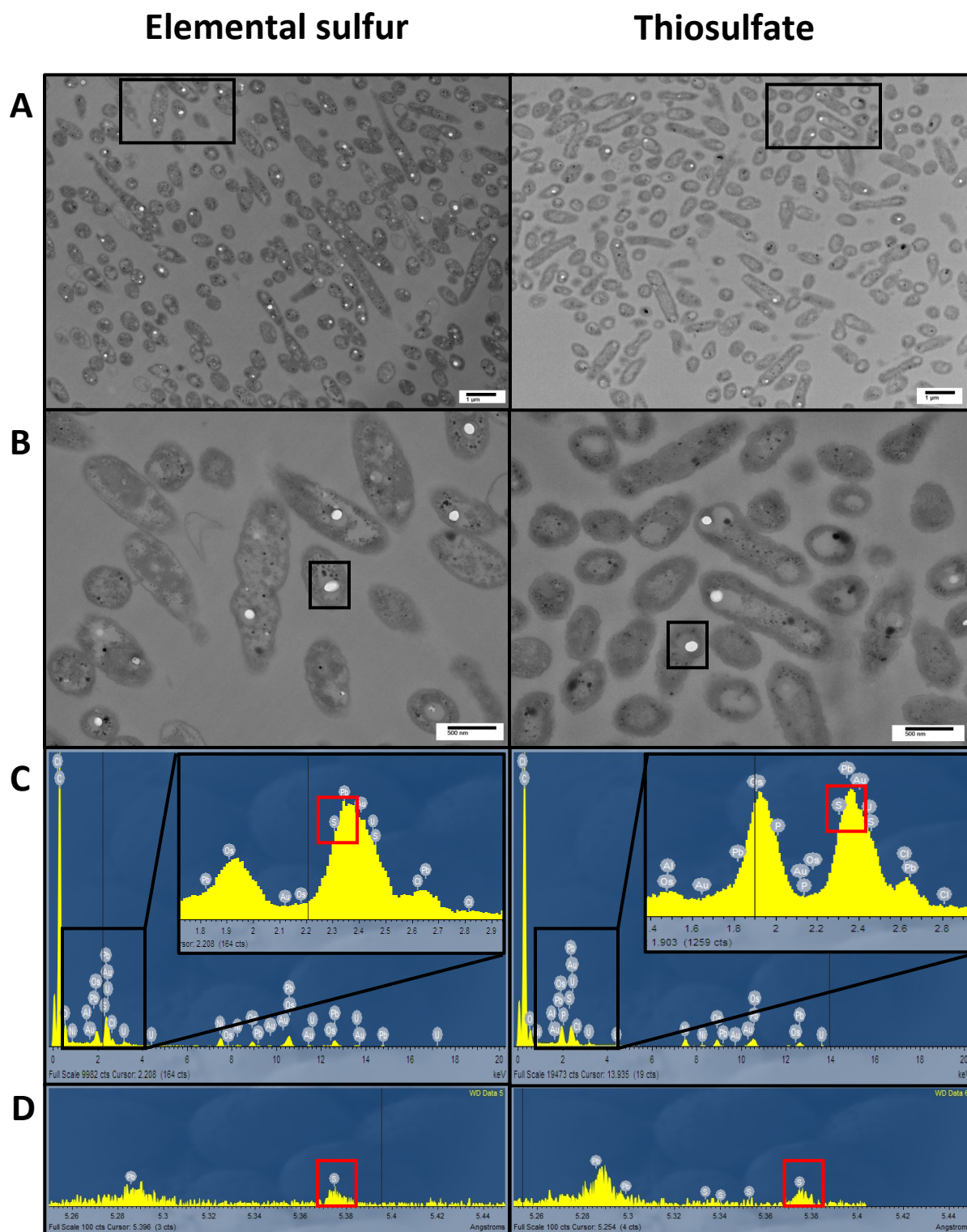


FIGURE 5

2.12 Supplementary information

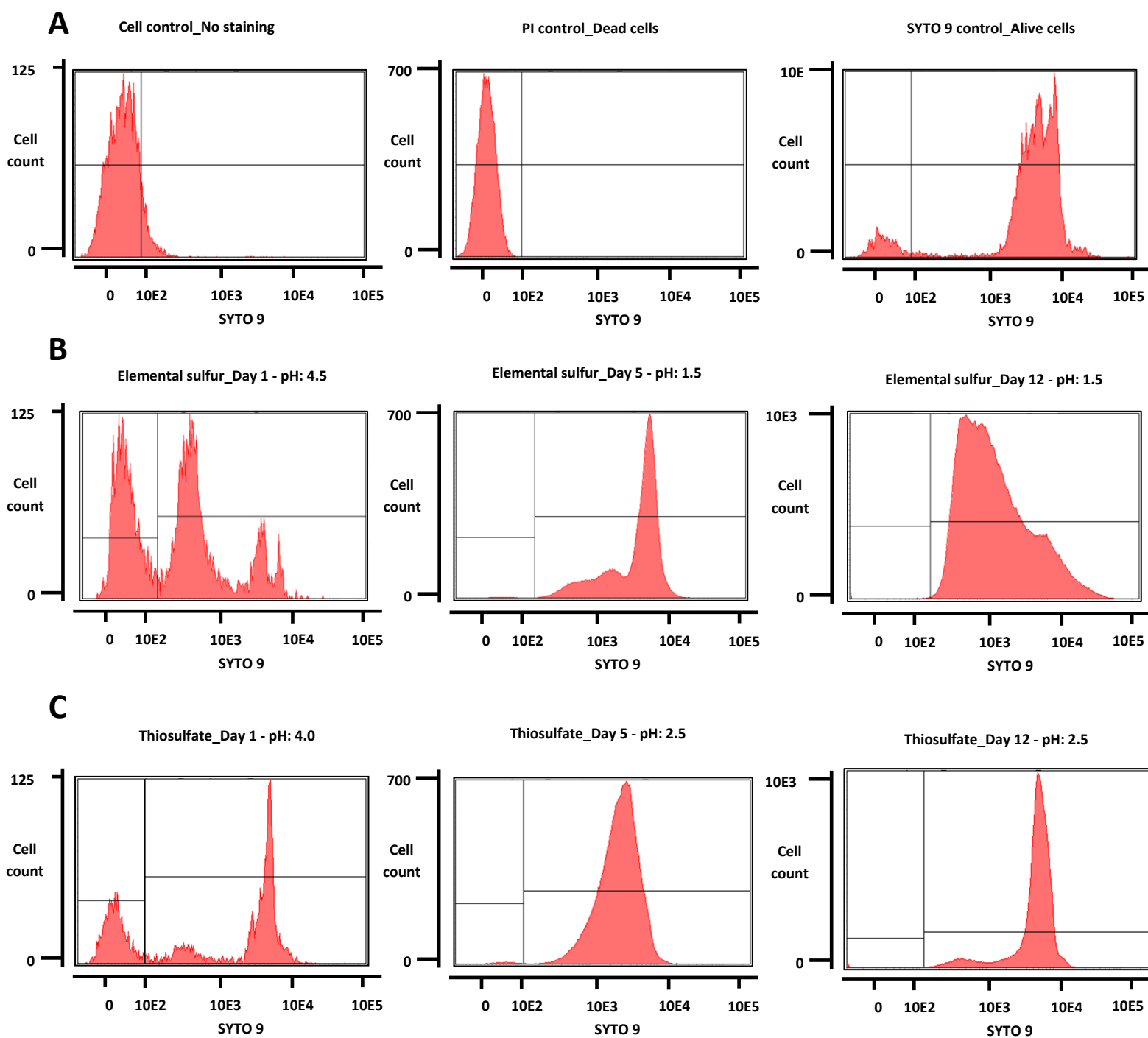
Supplementary information

Figure S1. Determination of the viability of *A. thiooxidans* ATCC 19377 during growth in elemental sulfur or thiosulfate medium. The Live/Dead stain marker is a combination of SYTO 9 and propidium iodine in the same proportion. The stain marker is added to a sample of cells to verify viability. The SYTO 9, present in the stain marker, stains all cells (alive and dead). The propidium iodide only stains the dead cells. As the cells are being damaged, the propidium iodine will enter the cells and the quantity of SYTO 9 in them will decrease. **A:** Controls. The PI control represents the position of dead cells on the graph. Cells were treated with 70% alcohol before adding propidium iodine. The SYTO 9 control represents the position of alive cells on the graph. **B:** Elemental sulfur medium. At day 5 of growth the major proportion of cells are alive, because of the predominant spike between the values of 10^3 and 10^4 of SYTO 9, as compared to the positive control. Day 12 shows the majority of the cells as damaged, because of the presence of propidium iodide inside of the cells, as indicated by the shift to the left in the proportion of cells on the graph. **C:** Thiosulfate sulfur medium. The bacteria tend to live longer in the medium, because of the value of SYTO 9 still being high (10^3 - 10^4) after 12 days of growth.

Table S1. Comparison of the percentage of concordant pair alignments between our assembly and the published assembly with 164 contigs.

Genome	Elemental sulfur pH 1.5	Elemental sulfur pH 2.5	Thiosulfate pH 2.5
20 contigs genome	92.3	92.1	92.4
164 contigs genome	29.5	59.5	56.8

Table S2. Top 50 upregulated genes after growth on elemental sulfur at pH 2.5 as compared to pH 1.5.

p-value	FPKM	LOG2	Genes
2.71E-01	42.98	8.78	16S ribosomal RNA
1.11E-01	4926.88	6.15	putative globin-like protein aq_211
2.15E-01	48.31	5.71	16S ribosomal RNA
7.19E-02	735.70	5.00	Xylene monooxygenase electron transfer component
7.70E-05	743.07	4.68	hypothetical protein
1.13E-02	690.12	4.45	Chemotaxis protein CheY
2.44E-02	339.73	4.38	STAS domain protein
4.08E-02	101.34	4.12	hypothetical protein
8.49E-03	792.53	4.01	Methyl-accepting chemotaxis protein 3
4.47E-02	4950.47	3.99	hypothetical protein
4.05E-01	599.51	3.90	tRNA-Lys(ttt)
2.26E-02	374.81	3.88	Chemotaxis protein CheA
4.07E-01	6.51	3.81	hypothetical protein
2.09E-02	199.92	3.72	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase 2
3.79E-03	1123.46	3.72	Flagellar hook protein FlgE
2.48E-02	409.85	3.56	Biofilm dispersion protein BdlA
4.14E-01	6540.13	3.54	tRNA-Trp(cca)
4.48E-03	1169.28	3.54	Basal-body rod modification protein FlgD
4.51E-02	452.51	3.52	DNA-3-methyladenine glycosylase
2.61E-02	576.58	3.52	Methyl-accepting chemotaxis serine transducer
5.39E-03	1059.93	3.46	hypothetical protein
1.40E-05	189.60	3.43	Flagellar biosynthetic protein FliR
1.42E-02	1023.61	3.42	hypothetical protein
1.82E-03	724.00	3.41	Flagellar biosynthetic protein FliP
6.17E-03	561.07	3.38	Chemotaxis protein CheA
2.46E-02	549.99	3.36	putative chemoreceptor glutamine deamidase CheD
1.56E-02	1065.97	3.35	Flagellar basal-body rod protein FlgC
1.17E-02	439.38	3.33	hypothetical protein
4.23E-02	874.01	3.28	Cytochrome bd-I ubiquinol oxidase subunit 2
1.00E-05	160.77	3.27	Flagellar biosynthetic protein FlhB
8.33E-03	554.28	3.26	hypothetical protein
4.69E-01	287.73	3.21	tRNA-Pro(ggg)
8.23E-03	833.92	3.21	Metallo-beta-lactamase superfamily protein
6.19E-03	1142.73	3.19	Chemotaxis protein CheY
1.66E-02	1435.00	3.18	Flagellar basal body rod protein FlgB
1.03E-02	772.58	3.18	FlgN protein
1.56E-02	839.46	3.17	Flagellar basal-body rod protein FlgF
7.00E-02	1220.94	3.16	Cytochrome bd-II ubiquinol oxidase subunit 1
1.25E-02	238.24	3.13	putative signaling protein
4.74E-01	455.44	3.07	tRNA-Gln(ttg)

9.79E-04	286.66	3.07	Flagellar brake protein YcgR
2.16E-02	1347.68	3.06	hypothetical protein
1.01E-02	1017.38	3.05	hypothetical protein
1.69E-03	1391.39	3.05	flagellar protein FliS
4.67E-02	312.68	3.04	Chemotaxis protein methyltransferase 3
7.09E-02	695.87	3.02	Cytochrome c biogenesis protein CcsB
4.37E-03	2725.95	2.99	hypothetical protein
6.46E-03	440.43	2.99	Flagellar hook-length control protein
1.90E-02	413.96	2.98	Chemotaxis protein CheV
1.26E-01	12.18	2.98	Glycosyl transferase family 2

Table S3. Top 50 upregulated genes after growth on thiosulfate at pH 2.5 as compared to elemental sulfur pH 1.5.

p-value	FPKM	LOG2	Genes
2.93E-01	62.68	9.32	16S ribosomal RNA
1.32E-01	76.35	7.25	hypothetical protein
1.73E-01	6597.13	6.57	putative globin-like protein aq_211
8.00E-05	740.67	6.35	putative protein
2.97E-01	65.53	6.15	16S ribosomal RNA
1.36E-03	17859.50	5.84	hypothetical protein
1.35E-01	1136.18	5.62	Xylene monooxygenase electron transfer component
1.02E-02	734.44	5.48	hypothetical protein
1.50E-04	758.90	5.45	Cation efflux system protein CusC
1.00E-04	802.89	5.19	putative transporter
3.85E-03	14719.90	4.65	hypothetical protein
9.26E-04	20973.40	4.52	DsrE/DsrF-like family protein
1.37E-02	188.27	4.17	Osmolarity sensor protein EnvZ
4.14E-02	2952.08	4.15	hypothetical protein
1.45E-01	680.51	4.11	DNA-3-methyladenine glycosylase
4.52E-03	1178.45	3.91	ABC transporter, phosphonate, periplasmic substrate-binding protein
3.44E-03	369.92	3.90	hypothetical protein
5.69E-02	1291.91	3.78	Transcriptional regulatory protein OmpR
1.49E-03	6352.36	3.64	Thiol:disulfide interchange protein DsbG
8.47E-04	7884.33	3.53	Cytochrome c biogenesis protein CcsA
8.97E-04	2678.03	3.27	hypothetical protein
4.50E-05	1895.24	3.26	Transcriptional regulatory protein OmpR
1.29E-03	819.75	3.26	Cytochrome c biogenesis protein CcsB
2.13E-04	338.77	3.19	Osmolarity sensor protein EnvZ
1.47E-03	115.31	3.13	Lipoprotein-releasing system ATP-binding protein LolD
4.10E-04	4880.44	3.10	hypothetical protein

4.90E-05	960.76	3.08	Cytochrome c biogenesis protein CcsA
1.79E-01	478.14	3.01	putative protein YeaO
8.70E-04	4131.53	2.96	hypothetical protein
2.75E-03	766.06	2.92	Thiol:disulfide interchange protein DsbD
4.12E-03	49.04	2.86	hypothetical protein
3.31E-01	3.34	2.85	hypothetical protein
4.86E-01	280.35	2.80	tRNA-Lys(ttt)
4.99E-03	171.98	2.71	Transcriptional regulatory protein ZraR
2.83E-04	225.84	2.69	hypothetical protein
1.23E-01	8.92	2.67	hypothetical protein
1.05E-03	9721.32	2.67	hypothetical protein
4.76E-04	2491.13	2.63	Glutamate racemase
2.12E-02	122.59	2.63	Multidrug resistance protein MdtA
1.94E-02	441.22	2.55	Sec-independent protein translocase protein TatC
4.41E-04	7.45	2.49	hypothetical protein
9.62E-03	147.88	2.43	Ammonia channel
3.70E-03	279.88	2.43	hypothetical protein
7.90E-05	287.10	2.40	Flagella basal body P-ring formation protein FlgA
7.94E-03	273.44	2.40	Transposase
5.31E-03	59.46	2.39	Protein CyaE
9.51E-03	1627.58	2.34	hypothetical protein
2.69E-04	809.73	2.32	hypothetical protein
6.98E-03	141.62	2.32	HlyD family secretion protein
8.44E-02	7.47	2.31	Hydrolase in pqqF 5'region

Table S4. Top 50 downregulated genes after growth on elemental sulfur at pH 2.5 as compared to pH 1.5.

p-value	FPKM	LOG2	Genes
3.61E-01	26.96	-6.55	hypothetical protein
3.66E-01	129.99	-6.26	hypothetical protein
3.68E-01	90.04	-6.07	hypothetical protein
3.67E-01	70.83	-6.05	hypothetical protein
3.67E-01	75.00	-6.04	hypothetical protein
3.67E-01	42.30	-5.98	hypothetical protein
3.68E-01	72.61	-5.96	hypothetical protein
3.67E-01	63.09	-5.95	hypothetical protein
3.68E-01	46.96	-5.94	hypothetical protein
3.65E-01	42.37	-5.92	hypothetical protein
3.68E-01	67.87	-5.90	hypothetical protein
3.65E-01	55.69	-5.89	hypothetical protein

3.68E-01	112.53	-5.86	hypothetical protein
3.66E-01	49.85	-5.86	hypothetical protein
3.64E-01	41.91	-5.86	hypothetical protein
3.66E-01	60.91	-5.82	hypothetical protein
3.67E-01	98.17	-5.82	hypothetical protein
3.65E-01	204.11	-5.82	hypothetical protein
3.69E-01	60.88	-5.81	hypothetical protein
3.70E-01	254.82	-5.80	hypothetical protein
3.67E-01	86.34	-5.80	hypothetical protein
3.68E-01	37.68	-5.79	hypothetical protein
3.67E-01	52.53	-5.78	Nucleoid occlusion protein
3.66E-01	71.47	-5.77	hypothetical protein
3.68E-01	26.08	-5.76	hypothetical protein
3.69E-01	38.62	-5.74	hypothetical protein
3.67E-01	57.77	-5.74	hypothetical protein
3.69E-01	85.93	-5.71	Single-stranded DNA-binding protein
3.68E-01	96.85	-5.70	hypothetical protein
3.67E-01	40.19	-5.67	hypothetical protein
3.66E-01	47.84	-5.65	hypothetical protein
3.66E-01	55.51	-5.65	hypothetical protein
3.68E-01	37.68	-5.62	hypothetical protein
3.67E-01	40.47	-5.61	hypothetical protein
3.66E-01	79.07	-5.59	hypothetical protein
3.66E-01	56.27	-5.59	hypothetical protein
3.68E-01	127.91	-5.58	hypothetical protein
3.63E-01	11.50	-5.55	hypothetical protein
3.69E-01	76.44	-5.52	hypothetical protein
3.64E-01	59.73	-5.48	ThiF family protein
3.69E-01	65.72	-5.43	Calcineurin-like phosphoesterase superfamily domain protein
3.69E-01	66.37	-5.41	hypothetical protein
3.68E-01	40.16	-5.40	hypothetical protein
3.62E-01	17.67	-5.37	hypothetical protein
3.67E-01	85.81	-5.36	hypothetical protein
3.65E-01	247.11	-5.35	hypothetical protein
3.71E-01	32.22	-5.21	hypothetical protein
3.68E-01	110.20	-5.20	hypothetical protein
3.69E-01	58.58	-5.15	DNA polymerase III subunit beta
3.64E-01	42.33	-5.14	hypothetical protein

Table S5. Top 50 downregulated genes after growth on thiosulfate at pH 2.5 as compared to elemental sulfur pH 1.5.

p-value	FPKM	LOG2	Genes
3.62E-01	7.22	-5.42	hypothetical protein
2.77E-02	30.77	-5.24	hypothetical protein
3.47E-01	0.25	-5.24	hypothetical protein
3.35E-01	0.18	-5.14	hypothetical protein
3.76E-01	444.80	-5.00	hypothetical protein
1.06E-02	104.24	-5.00	hypothetical protein
4.63E-02	53.59	-4.83	hypothetical protein
2.45E-02	22.15	-4.73	hypothetical protein
2.24E-02	37.28	-4.66	hypothetical protein
3.36E-01	0.15	-4.61	hypothetical protein
3.77E-01	143.15	-4.59	hypothetical protein
3.78E-01	8.20	-4.55	hypothetical protein
3.20E-02	57.62	-4.49	hypothetical protein
3.95E-01	40.05	-4.40	tRNA-Asn(gtt)
3.82E-01	214.90	-4.39	hypothetical protein
3.82E-01	492.89	-4.34	hypothetical protein
2.58E-02	20.93	-4.32	Nodulation protein NolG
3.77E-01	27.82	-4.28	hypothetical protein
2.54E-02	111.48	-4.28	hypothetical protein
2.14E-02	316.48	-4.25	hypothetical protein
3.84E-01	237.89	-4.24	Single-stranded DNA-binding protein
4.75E-02	25.69	-4.23	hypothetical protein
2.06E-02	130.27	-4.18	hypothetical protein
3.81E-01	8.74	-4.16	DNA ligase
3.86E-01	115.20	-4.16	hypothetical protein
3.71E-01	16.67	-4.16	Helicase associated domain protein
3.80E-01	23.98	-4.15	hypothetical protein
3.84E-01	222.36	-4.13	hypothetical protein
3.84E-01	165.00	-4.13	hypothetical protein
3.80E-01	582.56	-4.11	hypothetical protein
3.87E-01	348.92	-4.11	hypothetical protein
3.85E-01	163.94	-4.11	hypothetical protein
3.87E-01	198.71	-4.10	hypothetical protein
3.82E-01	146.45	-4.10	hypothetical protein
3.86E-01	122.17	-4.10	hypothetical protein
3.86E-01	157.14	-4.09	hypothetical protein
3.83E-01	163.38	-4.09	hypothetical protein
3.84E-01	151.43	-4.08	hypothetical protein
3.87E-01	170.41	-4.08	hypothetical protein
3.87E-01	293.93	-4.07	hypothetical protein

3.84E-01	144.87	-4.05	hypothetical protein
3.87E-01	283.24	-4.05	hypothetical protein
3.80E-01	10.97	-4.05	hypothetical protein
3.87E-01	85.79	-4.04	hypothetical protein
3.86E-01	211.21	-4.03	hypothetical protein
3.85E-01	712.51	-4.01	hypothetical protein
3.86E-01	128.00	-4.00	hypothetical protein
3.88E-01	411.17	-3.99	hypothetical protein
3.73E-01	17.79	-3.98	hypothetical protein
3.81E-01	111.16	-3.95	hypothetical protein

Table S6. Top 50 upregulated genes after growth on elemental sulfur at pH 2.5 as compared to thiosulfate pH 2.5.

p-value	FPKM	LOG2	Genes
1.61E-02	365.21	4.04	hypothetical protein
1.91E-03	1656.05	4.02	hypothetical protein
6.80E-03	1593.95	3.94	NADH-quinone oxidoreductase subunit L
3.61E-01	151.44	3.71	putative multidrug resistance protein EmrY
1.18E-03	304.67	3.59	hypothetical protein
3.72E-03	223.33	3.42	Nodulation protein NodG
1.19E-04	799.66	3.41	hypothetical protein
6.22E-03	1336.96	3.36	CobQ/CobB/MinD/ParA nucleotide binding domain protein
4.20E-01	2452.55	3.35	tRNA-Thr(ggt)
1.08E-02	3169.29	3.32	hypothetical protein
5.43E-03	296.13	3.27	hypothetical protein
8.36E-02	1019.12	3.19	hypothetical protein
1.88E-02	929.70	3.16	hypothetical protein
8.45E-03	459.09	3.10	hypothetical protein
4.87E-03	232.78	3.08	hypothetical protein
2.90E-05	212.04	3.05	hypothetical protein
6.80E-02	1058.54	3.02	hypothetical protein
1.67E-02	690.12	3.01	Chemotaxis protein CheY
2.88E-02	374.81	3.00	Chemotaxis protein CheA
3.45E-02	339.73	2.98	STAS domain protein
3.16E-01	0.31	2.94	Rhodopirellula transposase
2.33E-01	236.32	2.94	Cytochrome bd-II ubiquinol oxidase subunit 2
1.47E-02	2695.43	2.94	50S ribosomal protein L7/L12
1.41E-02	276.06	2.89	hypothetical protein
5.46E-04	743.07	2.74	hypothetical protein
3.44E-02	576.58	2.74	Methyl-accepting chemotaxis serine transducer

3.45E-01	72.11	2.72	Fusaric acid resistance protein FusA
4.57E-03	377.74	2.71	hypothetical protein
4.65E-03	127.69	2.67	hypothetical protein
2.20E-01	270.40	2.64	Blue copper oxidase CueO
3.40E-03	796.31	2.63	ATP synthase gamma chain
5.35E-03	754.11	2.56	ATP synthase epsilon chain
7.27E-03	3106.66	2.55	50S ribosomal protein L10
1.60E-02	792.53	2.52	Methyl-accepting chemotaxis protein 3
2.19E-01	132.59	2.51	2-isopropylmalate synthase
4.62E-01	303.63	2.51	tRNA-Val(cac)
2.22E-01	216.52	2.50	Cytochrome bd ubiquinol oxidase subunit 1
5.96E-03	2248.89	2.50	TraT complement resistance protein
2.57E-03	1193.21	2.48	ATP synthase subunit alpha
1.39E-04	184.35	2.48	Capsule polysaccharide export outer membrane protein CtrA
3.65E-03	1318.97	2.44	ATP synthase subunit beta
7.61E-02	12.18	2.37	Glycosyl transferase family 2
7.36E-02	36.98	2.34	RNA polymerase sigma factor RpoS
2.39E-03	801.26	2.33	ATP synthase subunit delta
5.19E-02	124.94	2.33	ATP-binding protein BexA
6.48E-03	660.05	2.23	DNA-directed RNA polymerase subunit beta
1.37E-01	439.74	2.22	Cytochrome bd ubiquinol oxidase subunit 1
3.33E-02	96.75	2.21	Capsule polysaccharide export inner-membrane protein CtrC
1.27E-02	693.33	2.20	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'
3.47E-03	1481.47	2.18	ATP synthase subunit b

Table S7. Top 50 downregulated genes after growth on elemental sulfur at pH 2.5 as compared to thiosulfate pH 2.5.

p-value	FPKM	LOG2	Genes
1.31E-01	0.11	-9.40	hypothetical protein
1.28E-01	0.17	-8.84	hypothetical protein
8.30E-05	13.89	-5.74	putative protein
1.57E-04	23.79	-5.00	Cation efflux system protein CusC
1.06E-02	24.27	-4.92	hypothetical protein
1.05E-04	30.52	-4.72	putative transporter
1.40E-01	3.91	-3.88	23S ribosomal RNA
4.37E-02	217.63	-3.76	hypothetical protein
1.46E-02	13.92	-3.76	Osmolarity sensor protein EnvZ
1.65E-03	150.95	-3.70	hypothetical protein
5.40E-05	4.67	-3.62	hypothetical protein
2.14E-04	407.47	-3.58	hypothetical protein

3.75E-03	33.17	-3.48	hypothetical protein
6.00E-02	117.39	-3.46	Transcriptional regulatory protein OmpR
3.35E-04	5.98	-3.36	hypothetical protein
6.80E-05	0.19	-3.28	Protein TolB
3.70E-05	203.27	-3.22	Transcriptional regulatory protein OmpR
7.37E-03	179.64	-3.18	hypothetical protein
2.37E-04	169.94	-3.17	Cytochrome c biogenesis protein CcsA
3.51E-04	203.15	-3.17	hypothetical protein
1.59E-02	51.46	-3.15	hypothetical protein
2.35E-03	75.13	-3.12	Cytochrome c biogenesis protein CcsB
4.40E-05	7.24	-3.10	ISXO2-like transposase domain protein
2.45E-03	14.92	-2.91	hypothetical protein
1.78E-03	16.08	-2.74	hypothetical protein
9.76E-04	7.01	-2.65	Outer membrane lipoprotein Slp family protein
1.72E-02	70.10	-2.64	hypothetical protein
1.36E-03	0.06	-2.60	Penicillin-binding protein 1A
2.70E-03	486.91	-2.56	hypothetical protein
3.95E-02	665.72	-2.51	hypothetical protein
2.17E-02	21.72	-2.50	Multidrug resistance protein MdtA
9.33E-03	2669.52	-2.46	hypothetical protein
1.12E-04	7.91	-2.46	hypothetical protein
2.47E-03	1446.84	-2.45	Cytochrome c biogenesis protein CcsA
4.79E-02	26.96	-2.44	hypothetical protein
4.59E-03	30.35	-2.43	hypothetical protein
7.70E-04	10.36	-2.43	putative parvulin-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
3.11E-04	2.42	-2.42	Outer membrane protein assembly factor BamD
4.62E-03	894.49	-2.42	hypothetical protein
3.37E-02	1.48	-2.40	Multidrug resistance protein MdtA
1.31E-02	49.10	-2.40	Thymidylate kinase
6.36E-04	9.44	-2.38	hypothetical protein
2.91E-03	4035.40	-2.38	DsrE/DsrF-like family protein
3.67E-03	1222.25	-2.38	Thiol:disulfide interchange protein DsbG
5.23E-02	0.15	-2.36	Multidrug resistance protein MdtB
5.38E-03	9.80	-2.32	hypothetical protein
5.11E-03	11.93	-2.32	Protein CyaE
1.56E-03	2.56	-2.32	hypothetical protein
3.90E-02	0.76	-2.31	hypothetical protein
2.11E-03	90.42	-2.31	hypothetical protein

Table S8. Concentration of the different sulfur species during growth of *A. thiooxidans* in elemental sulfur medium.

Day	pH	S²⁻ (mM)	SO₄²⁻ (mM)	S₂O₃²⁻ (mM)
0	4.50	0.00	3.55	0.00
1	3.30	0.00	4.06	0.40
2	2.20	0.00	6.42	0.48
3	1.70	0.00	10.16	0.00
4	1.65	0.00	15.22	0.51
5	1.50	0.00	17.18	0.78

Day	SO₃²⁻ (mM)	Other SOI (mM)	Total Aqueous SOI (mM)	Total Aqueous S (mM)
0	0.00	0.10	0.10	3.65
1	0.00	0.24	0.64	4.70
2	0.00	6.17	6.66	13.08
3	0.00	14.91	14.91	25.07
4	0.00	12.65	13.16	28.38
5	0.00	25.08	25.86	43.04

Day	Non Aqueous (S₀) (mM)	Total S (mM)
0	308.22	311.87
1	307.17	311.87
2	298.79	311.87
3	286.80	311.87
4	283.49	311.87
5	268.83	311.87

Table S9. Concentration of the different sulfur species during growth of *A. thiooxidans* in thiosulfate medium.

Day	pH	S ²⁻ (mM)	SO ₄ ²⁻ (mM)	S ₂ O ₃ ²⁻ (mM)
0	4.55	0.03	4.27	27.91
2	2.30	0.07	12.14	9.06
4	2.45	0.03	12.07	5.01

Day	SO ₃ ²⁻ (mM)	Other SOI (mM)	Total Aqueous SOI (mM)	Total Aqueous S (mM)
0	0.00	8.10	36.01	40.30
2	0.00	17.35	26.40	38.61
4	0.25	14.43	19.68	31.78

Day	Non Aqueous (S ₀) (mM)	Total S (mM)
0	0.00	40.30
2	1.69	40.30
4	8.52	40.30

Elemental sulfur

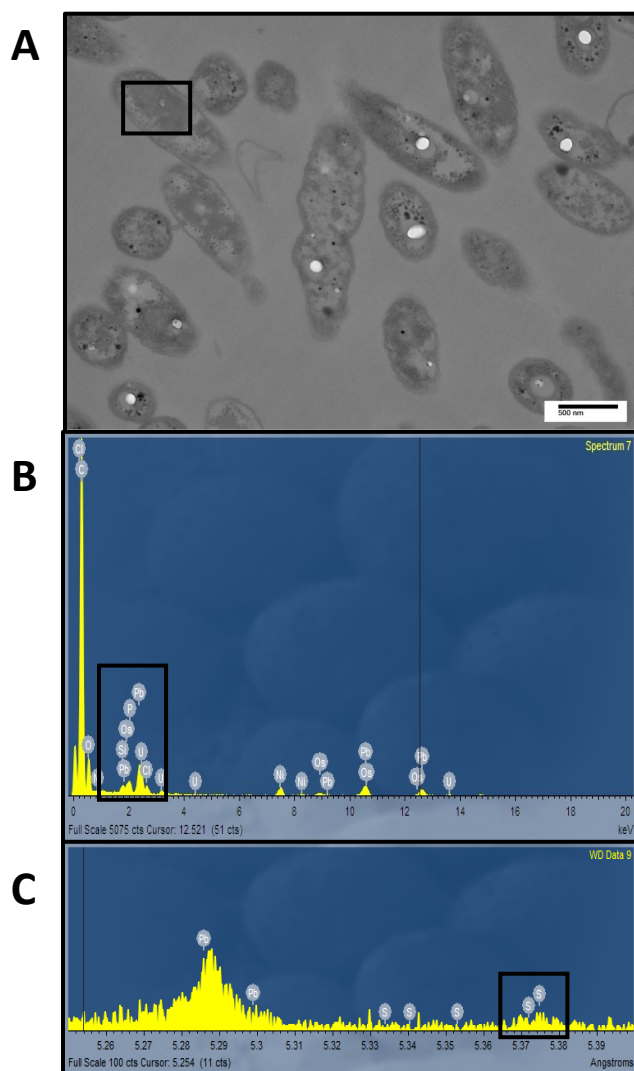


Figure S2. Energy-dispersive X-ray spectroscopy coupled with transmission electron microscopy (TEM) of a non-sulfur globule region of *A. thiooxidans* ATCC 19377. A. Negative staining coupled with TEM (Magnification at 21 000X). **B.** Energy-dispersive X-ray spectroscopy of the selected bacterial region. No sulfur element detected. **C.** Wavelength dispersive spectroscopy coupled with scanning electron microscopy to separate the element lead (lead is present in the electron microscopy disk) from the element sulfur. Background detection of sulfur only.

Chapitre 3

ANNEXE - PCR EN TEMPS REEL

3.1 Design des amorces

En plus des analyses transcriptomiques par RNA-seq, nous avons commencé ce projet en utilisant la méthode du PCR en temps réel (qPCR) comme technique pour l'analyse de l'expression des gènes. Tout d'abord, nous avons synthétisé les amorces nécessaires pour chaque gène du métabolisme du soufre chez *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 19377. Il faut noter que notre nouvel assemblage du génôme n'était pas encore disponible; le génôme utilisé pour déterminer les amorces fut celui de la version ébauche (Valdés *et al.*, 2011). Le tableau I montre la séquence des différentes amorces qui ont été utilisées ainsi que leur température de fusion, leur pourcentage GC et la longueur des amplicons générés (Taylor *et al.*, 2010). Nous avons aussi synthétisé des amorces pour les gènes de référence (*recA*, *gyrA* et *rho*), qui ont été utilisés pour normaliser les résultats qPCR (Desroche *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2010).

La spécificité des amorces est cruciale lors d'une analyse qPCR. Nous avons utilisé nos amorces sur l'ADN génomique d'*A. thiooxidans* dans une expérience PCR pour déterminer la spécificité des amorces. La figure 3.1. montre les résultats de l'expérience PCR. On note que la plupart des amorces sont spécifiques à un seul site sur l'ADN génomique d'*A. thiooxidans*. Par contre, les amorces qui ciblent les gènes *sdo* et *paps* ne semblent pas être spécifiques et un produit spécifique de l'amplification n'a pas été généré.

Tableau I. Amorces utilisées pour des analyses qPCR sur les gènes du métabolisme du soufre.

Gène	Amorce	Sequence 5'-3'	% GC	Température de fusion (°C)	Longueur de l'amplicon (pb)
<i>tetH</i>	Forward	GGAAGCACTCCCGGTACAAA	55,0	59,96	120
	Reverse	CCAGTTTGAGCATTGACGGC	55,0	60,11	
<i>doxD</i>	Forward	TGACCCTGTTCTGGATTGCG	55,0	60,32	132
	Reverse	CCCGCACATCGGTCATTTTG	55,0	60,18	
<i>sqr</i>	Forward	AATCGAAGGCTTTGCCGAAC	50,0	59,48	123
	Reverse	TGGAAACGGGCAGAACCAAT	50,0	60,18	
<i>soxA-1</i>	Forward	ACGGGAAAACCTATGCGTCC	55,0	60,39	108
	Reverse	AACGCATCTGAGTCGTGACC	55,0	60,39	
<i>soxB-1</i>	Forward	TCTTGCCTGGACTTCGACAC	55,0	59,97	117
	Reverse	CAGCAGCAACACCTTGTCAC	55,0	59,97	
<i>soxX-1</i>	Forward	TTCAATCGCGCTCAGGGAAA	50,0	60,32	110
	Reverse	ATCTGCTGAAAGGTCACCCC	55,0	59,67	
<i>soxY-1</i>	Forward	AAACTAACGTGCCGGTGTC	50,0	60,18	119
	Reverse	AATGTAATCGTCCGCCGTCA	50,0	59,83	
<i>soxZ-1</i>	Forward	TGGAAAAGTCATTCCGGCCC	55,0	60,61	130
	Reverse	TTCGGCCCCGAATTTGAATG	50,0	60,11	
<i>sdo</i>	Forward	GCGATTTCTTGGTCTTGGGA	55,0	60,04	111
	Reverse	GAGCGTCACCGGTAAAAACC	55,0	59,49	
<i>aps</i>	Forward	TGGTCATCTGGTTTACGGGC	55,0	60,04	136
	Reverse	TTGGACAGAAAACGGCGGAT	50,0	60,25	
<i>paps</i>	Forward	GACTGGACCGCACAAACAAAC	55,0	59,97	132
	Reverse	CACCTGGGCCAAATCACTCT	55,0	59,96	
<i>rhd-1</i>	Forward	TGCGCGAACAAAAGGAATGG	50,0	60,04	130
	Reverse	CTGGCACACTGGCAAATGAC	55,0	60,04	
<i>hdrA-1</i>	Forward	CAAGCCGGAATGGGGTTTTG	55,0	60,04	140
	Reverse	ACCCTACGCAGAGCAGAATG	55,0	59,82	
<i>hdrB</i>	Forward	ACGACAACAGCATTCTCGGT	50,0	59,97	142
	Reverse	AATTCGCGCTCGGAGATGAT	50,0	59,97	
<i>hdrC</i>	Forward	GCGGATTCTACGCAAAGCAA	50,0	59,55	115
	Reverse	CACACCCGTCATTTCCCAGA	55,0	59,96	
<i>recA</i>	Forward	ATCCGCATGAAAATCGGGGT	50,0	60,11	134
	Reverse	CCCATGACCTCGTCACCTTT	55,0	59,68	
<i>gyrA</i>	Forward	GCCTTCATTACAGCATCGTCG	55,0	59,70	125
	Reverse	ATGAGCGGATCGAGGTTGAC	55,0	59,90	
<i>rho</i>	Forward	AGTGACCGATATGCAACGCT	50,0	59,82	116
	Reverse	CCAGCCGTTTGGCTTTTCA	50,0	59,90	

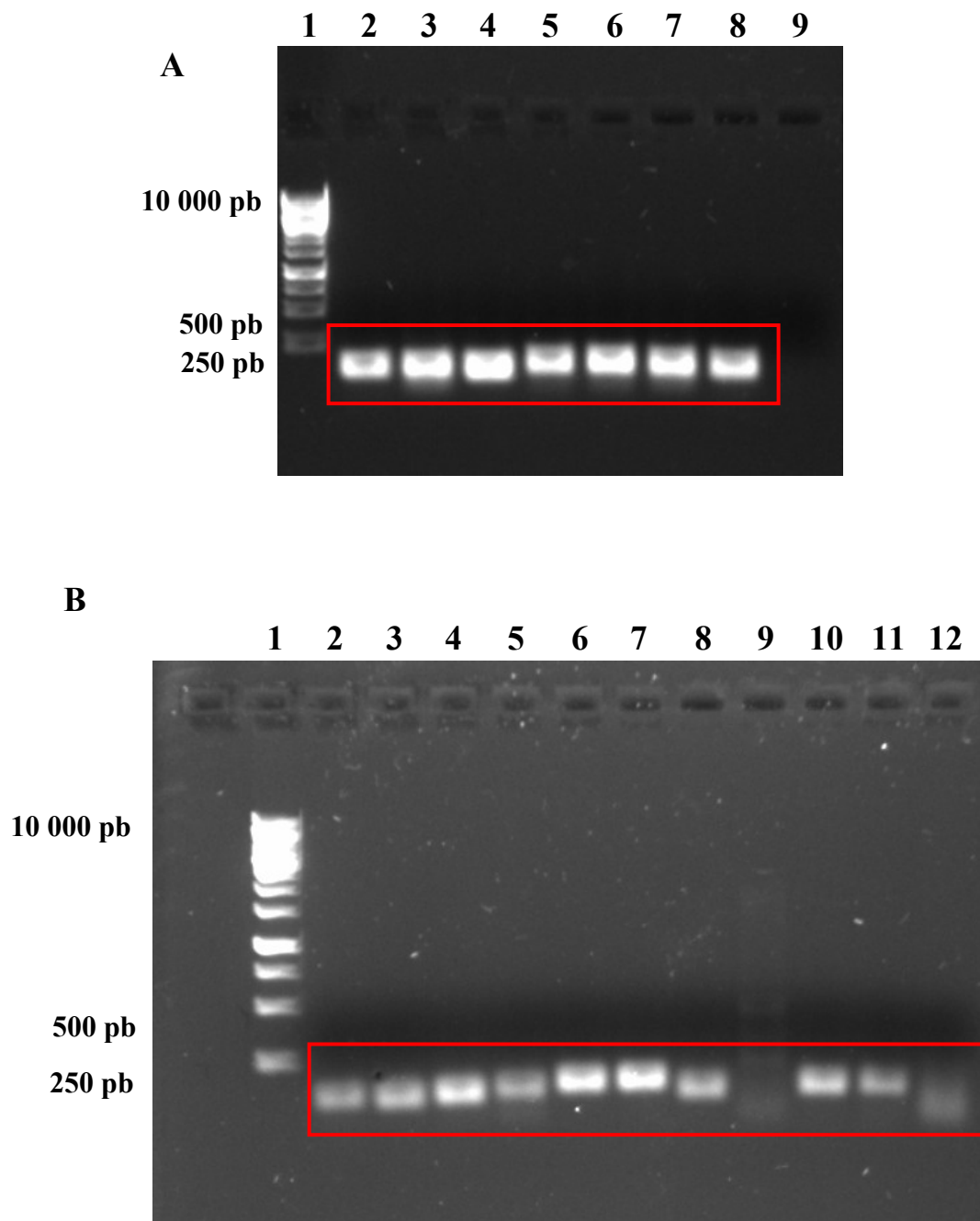


Figure 3.1. Amplification PCR des gènes cibles pour l'analyse qPCR. Paires d'amorces spécifiques pour chaque gène sur un gel d'agarose 1% utilisant l'ADN génomique d'*A. thiooxidans*. Migration à 120V pour 30 minutes. Les encadrés rouges montrent les gènes amplifiés. A1. Échelle de poids moléculaire *Gene Ruler* 1kb. A2. Gène *sqs*. A3. Gène *tetH*. A4. Gène *soxA-1*. A5. Gène *doxD*. A6. Gène *recA*. A7. Gène *gyrA*. A8. Gène *rho*. A9. Contrôle négatif sans ADN génomique (eau). B1. Échelle de poids moléculaire *Gene Ruler* 1kb. B2. Gène *soxB*. B3. Gène *soxX*. B4. Gène *soxY*. B5. Gène *soxZ*. B6. Gène *hdrA*. B7. Gène *hdrB*. B8. Gène *hdrC*. B9. Gène *sdo*. B10. Gène *rhd*. B11. Gène *aps*. B12. Gène *paps*.

3.2 Dégradation de l'ADN génomique et synthèse de l'ADN complémentaire

Pour réussir une expérience qPCR, il faut que seuls les ARN totaux de la cellule soient utilisés. La présence d'ADN génomique lors de la réaction d'amplification du qPCR pourrait induire une erreur au niveau du signal détecté. Pour ce faire, une étape de dégradation de l'ADN génomique a été effectuée après l'extraction des ARN totaux à partir d'une culture d'*A. thiooxidans* en soufre élémentaire (Figure 3.2.). On peut distinguer l'ADN génomique sur le gel d'agarose (plus haut que 10000 pb) sans l'ajout de DNase I après purification des ARN totaux; l'ajout de DNase I mène à la dégradation de l'ADN. Bien que l'enzyme DNase I dégrade la majeure partie de l'ADN génomique, un contrôle négatif sans *reverse transcriptase* a été effectué lors des analyses qPCR pour déterminer la présence de molécules traces d'ADN génomique.

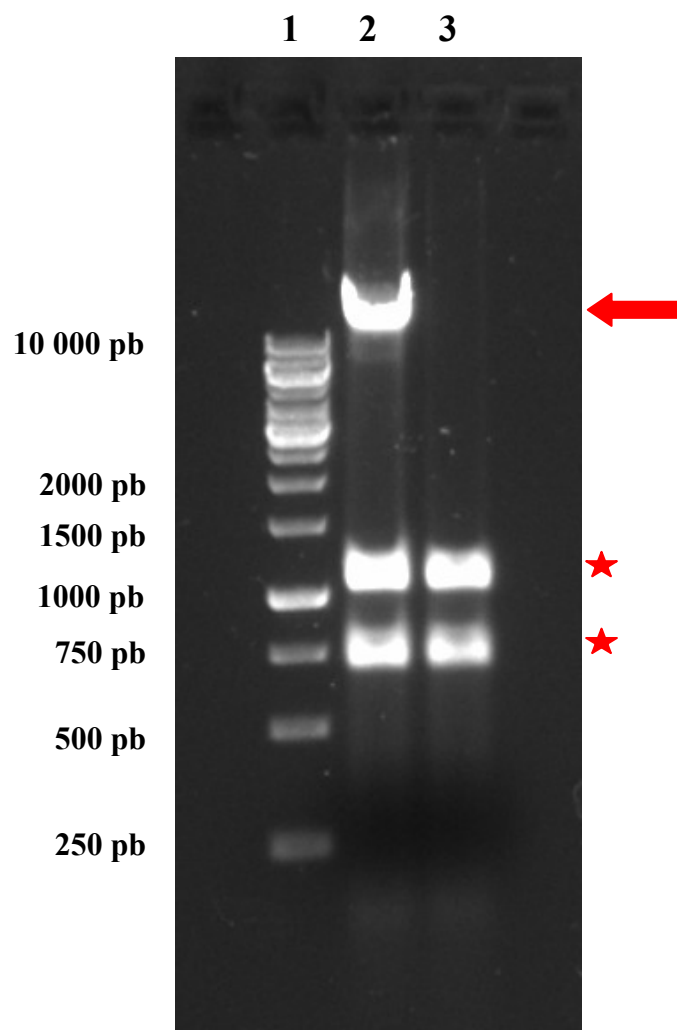


Figure 3.2. Électrophorèse sur gel d'agarose de l'extraction de l'ARN total d'une culture d'*Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 19377. L'extraction a été effectuée après cinq jours de cultivation d'*A. thiooxidans* en présence de soufre élémentaire. 1. Échelle de poids moléculaire *Gene Ruler* 1kb. 2. Extraction d'ARN total avant traitement à la DNase I. On remarque un signal de haute masse moléculaire en haut du gel représentant l'ADN génomique d'*A. thiooxidans* (flèche). Les deux signaux en position 1250 pb et 750 pb représentent l'ARN ribosomal 23S et 16S, respectivement (étoile). 3. ARN total après traitement à la DNase I.

Ensuite, nous avons converti l'ARN total en ADN complémentaire par une enzyme de transcription inverse en utilisant le kit *Transcriptor First Strand cDNA synthesis* (Roche). Nous avons opté pour une technologie utilisant des amorces d'hexamères aléatoires pour couvrir l'ensemble des ARN lors de la conversion des ARN en ADNc.

3.3 Détermination des paramètres des réactions qPCR

Par la suite, nous avons déterminé les paramètres de la réaction qPCR pour chaque gène. La figure 3.3. montre les paramètres de la réaction qPCR pour le gène *soxA-1*. Les paramètres sont identiques pour tous les gènes à l'exception de la température d'hybridation qui varie pour chaque paire d'amorce. La température de fusion des amorces pour le gène *soxA-1* est de 60°C. À cette température 50% des amorces s'hybrident sur l'ADNc. Il est donc nécessaire de régler la température lors de l'étape d'hybridation pour obtenir une hybridation proche du 100% sans perdre la spécificité des amorces pour la séquence cible. Nous avons réglé la température d'hybridation à 50°C pour obtenir une hybridation complète des amorces sur l'ADNc. Cet écart de quelques degrés entre la température de fusion des amorces et la température d'hybridation favorise l'hybridation des amorces sur l'ADNc (Bustin *et al.*, 2009).

Program Name	Pre-incubation						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:05:00	4.40		0	0	0
Program Name	Amplification						
Cycles	55	Analysis Mode	Quantification				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:10	4.40		0	0	0
50	None	00:00:10	2.20		0	0	0
72	Single	00:00:20	4.40		0	0	0
Program Name	Denaturation						
Cycles	1	Analysis Mode	Melting Curves				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:05	4.40		0	0	0
65	None	00:01:00	2.20		0	0	0
97	Continuous		0.11	5	0	0	0
Program Name	Cooling						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
40	None	00:00:30	2.20		0	0	0

Figure 3.3. Programme des réactions de l'analyse qPCR pour le gène *soxA-1*. Le programme comporte les étapes: pré-incubation, amplification, dénaturation et refroidissement (*cooling*). Durant la pré-incubation, le double brin des molécules d'ADNc est séparé à une température de 95°C. Puis, il y a amplification des ADNc: hybridation des amorces à 50°C et amplification par la polymérase Taq à 72°C. L'étape de dénaturation détermine la spécificité des amorces par la dénaturation thermique de l'amplicon produit durant la réaction. La dernière étape (*cooling*) sert à préserver les échantillons jusqu'à leur analyse.

3.4 Amplification du gène *soxA-1* par qPCR

La figure 3.4., montre la réaction qPCR du gène *soxA-1*. Une série de dilutions de 1/5 à 1/3125 a été effectuée pour déterminer la spécificité de la réaction. Nous avons ajouté les contrôles négatifs à cette réaction: contrôle -RT (sans ajout de *reverse transcriptase*; pour déterminer s'il reste des traces d'ADN génomique) à une concentration initiale de 1/20 et un contrôle sans ADNc (eau; pour déterminer si les amorces s'hybrident entre elles). Ensuite, pour la détection des amplicons lors du programme d'amplification, nous avons opté pour l'utilisation de la technique de coloration *SYBR Green*.

On peut constater que dans le cas du contrôle négatif sans *reverse transcriptase* il y a une amplification en cycle 35 et 45, signifiant la présence de traces d'ADN génomique. Cependant, la valeur moyenne d'amplification du contrôle (cycle 40) est considérée comme non-significative si cette valeur est égale à cinq cycles de plus que la dernière concentration de l'échantillon (cycle 35) (Bustin *et al.*, 2009). Le contrôle négatif sans ADNc amplifie seulement au 50e cycle et peut être considéré comme non-significatif.

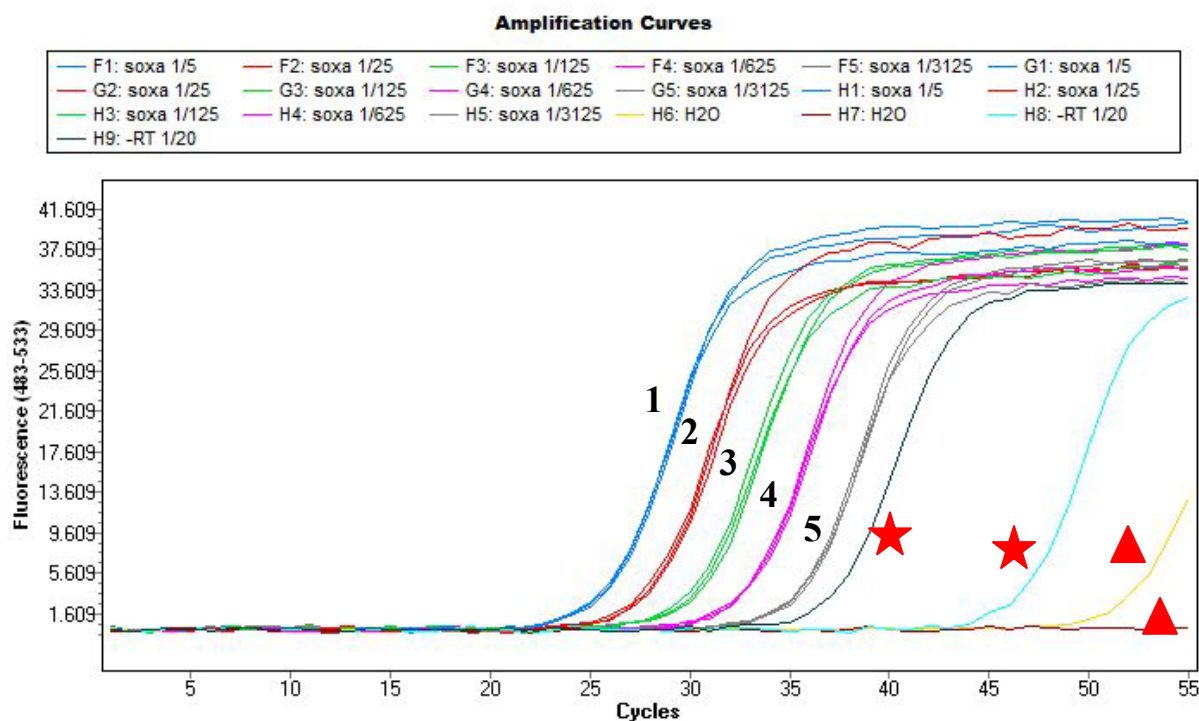


Figure 3.4. Amplification qPCR du gène *soxA-1*. Les points de contact (*crossing points*, cp) avec la base du graphique se font par la méthode de la seconde dérivée. Une série de dilutions de 1/5 jusqu'à 1/3125 à été effectué pour pouvoir déterminer une courbe standard de spécificité de la réaction de *soxA-1*. 1. Dilution 1/5. 2. Dilution 1/25. 3. Dilution 1/125. 4. Dilution 1/625. 5. Dilution 1/3125. Les courbes du contrôle négatif -RT (sans *reverse transcriptase*; sert à déterminer s'il y a contamination par l'ADN génomique) sont représentées par les étoiles rouges. Les courbes du contrôle sans ADNc (eau) sont représentées par les triangles rouges. Les échantillons sont faits en triplicata pour chaque concentration. Les contrôles sont faits en duplicata.

Pour déterminer que l'amplification visualisée par la courbe en qPCR est spécifique au gène *soxA-1*, nous avons procédé à une expérience de dénaturation thermique des amplicons générés (Figure 3.5.). Nous pouvons remarquer un seul signal distinctif à 86°C représentant une seule et unique amplification de toutes les dilutions de l'échantillon. Ce résultat corrèle avec l'expérience en PCR de la spécificité des amorces décrite en Figure 3.1. Le contrôle négatif sans *reverse transcriptase* se retrouve à 86°C sur la courbe de dénaturation, indiquant la présence de traces d'ADN génomique. Ce résultat corrèle avec l'amplification du signal du contrôle -RT aux cycles 35 et 45 en Figure 3.4. Le contrôle négatif sans ADNc (eau) est dénaturé thermiquement à la température de 78°C. Ce signal montre la présence de dimères d'amorces. Cependant, puisque le signal a été amplifié à plus de 50 cycles (Figure 3.4.), il est considéré comme non-significatif lors des analyses de quantification en qPCR.

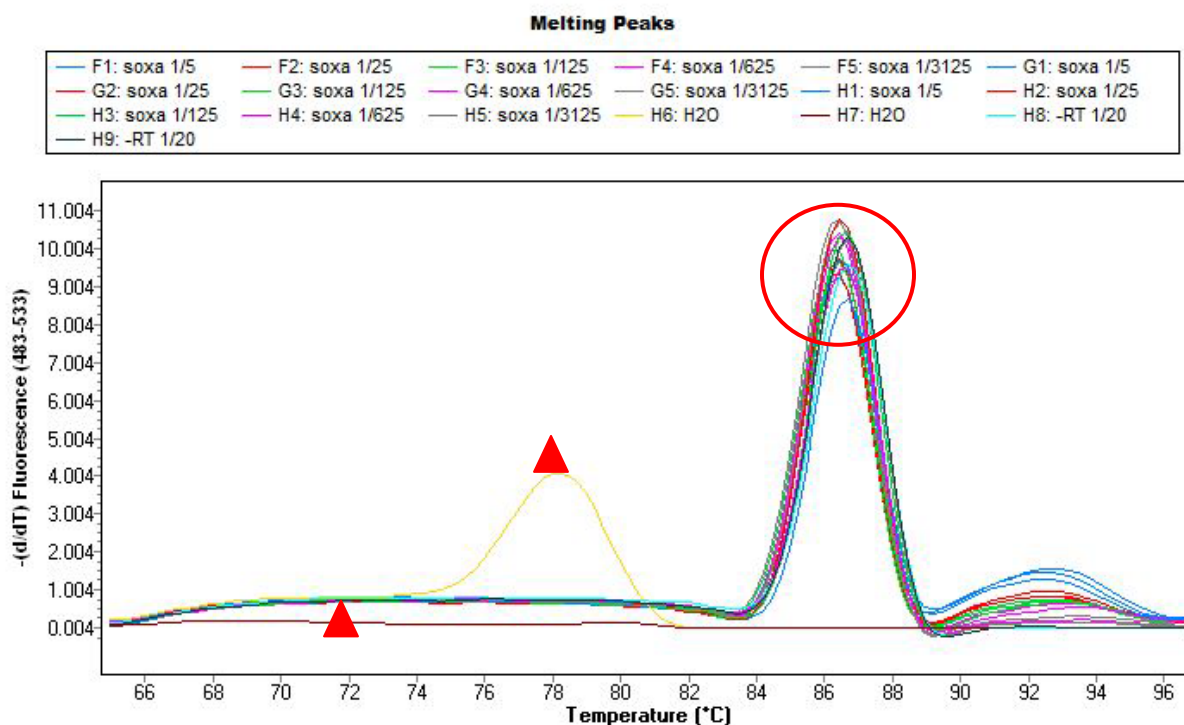


Figure 3.5. Courbes de dénaturation (*melting curve*) des amplicons de *soxA-I*. Un seul pic représentatif d'une seule amplification spécifique est montré (cercle rouge). Tous les amplicons générés sont spécifiques aux mêmes molécules d'ADNc. Les contrôles négatifs -RT sont représentés au même endroit que les courbes des échantillons, signifiant qu'il reste encore quelques traces d'ADN génomique. Les courbes du contrôle sans ADNc (eau) sont représentées par les triangles rouges. Le pic du contrôle négatif sans ADNc représente l'hybridation des amorces entre elles.

Finalemment en Figure 3.6., nous avons effectué une courbe standard de l'efficacité de la réaction en corrélant les dilutions de *soxA-1* par rapport aux cycles d'amplifications. L'efficacité de la courbe est de 2,171. Une valeur normale de spécificité est de valeur 2,0 et on considère que les valeurs entre 90% et 110% de la valeur normale sont valides (Bustin *et al.*, 2009). La pente de la courbe est de -2,970 et les valeurs normales de pente se situent entre -3,6 et -3,1. Par conséquent, la pente de cette courbe ne se retrouve pas dans les valeurs normales/attendues et la réaction avec le gène *soxA-1* nécessite d'être optimisée pour pouvoir être valide.

La prochaine étape serait d'optimiser les réactions avec l'ADNc d'*A. thiooxidans* cultivés dans un milieu de culture avec du thiosulfate. Il sera alors possible de comparer les valeurs des courbes d'amplification pour obtenir une quantification relative dans ces deux conditions de culture. Éventuellement, il faudrait faire ceci avec chaque gène du métabolisme du soufre.

En conclusion, cette technique demande encore de l'optimisation. Plusieurs paramètres peuvent être optimisés, notamment au niveau de la longueur de l'amplicon, de la température d'hybridation, du design des amorces, de l'extraction d'ARN total et de la conversion des ARN en ADNc (Smith & Osborn, 2009). Le plus grand facteur qui détermine la validité de la spécificité de la réaction est le design des amorces (Smith & Osborn, 2009). Bien que l'approche qPCR est excellente pour la quantification de gènes spécifiques (Smith & Osborn, 2009), nous avons décidé de nous diriger vers une approche de transcriptomique de haut débit (RNA-seq) pour cette étude et les analyses avec l'approche qPCR n'ont pas été continuées.

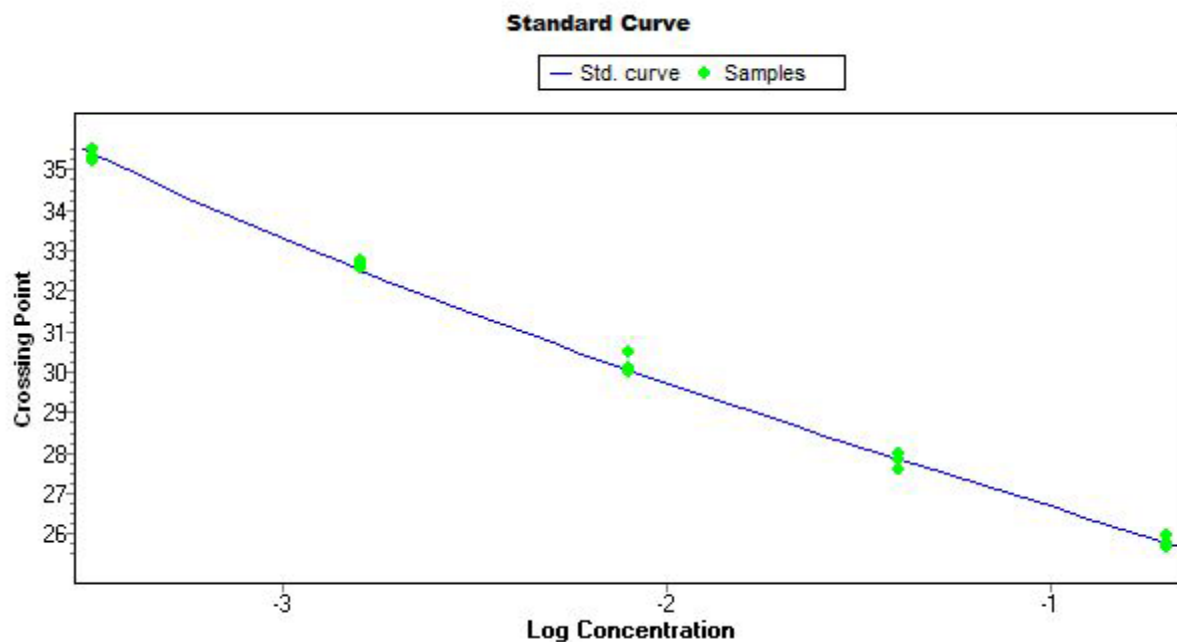


Figure 3.6. Courbe standard de la spécificité des amorces pour le gène *soxA-I*. Les différentes concentrations des standards (1/5, 1/25, 1/125, 1/625 et 1/3125) sont corrélées au *crossing point* de l'amplification des triplicatas. L'efficacité de la courbe est de 2,171. La pente de la courbe est de -2,970.

Chapitre 4

DISCUSSION

Cette étude visait à augmenter la compréhension du métabolisme du soufre chez *Acidithiobacillus thiooxidans* dans une optique de prévention et de remédiation de problèmes environnementaux qui peuvent être causées par l'extraction minière. Pour ce faire, nous avons opté pour une méthodologie employant la transcriptomique comme approche principale.

Tout d'abord, nous avons analysé l'expression des gènes des enzymes du métabolisme du soufre dans deux milieux de culture différents (soufre élémentaire et thiosulfate). Puisque ces deux milieux de culture contiennent des composés de soufre (sous deux différents états d'oxydation), nous aurions pu croire que l'expression des gènes du métabolisme du soufre soit similaire, mais ce n'était pas le cas. Nous avons constaté des changements importants du transcriptome. Les gènes du complexe Sox et de l'enzyme tetrathionate hydrolase étaient hautement exprimés dans le milieu de culture avec thiosulfate en comparaison avec le milieu avec soufre élémentaire. La bactérie exprime fortement les deux opérons du complexe Sox pour générer de l'énergie. Également, le gène qui code pour l'enzyme tetrathionate hydrolase (*tetH*) est hautement exprimé, signifiant la présence d'une quantité importante de tétrathionate, un produit intermédiaire, dans le métabolisme de la bactérie. Nous pouvons aussi observer une augmentation de l'expression du gène *paps*, codant l'enzyme phosphoadenosine phosphosulfate reductase, qui convertit le sulfite en phosphoadenosine phosphosulfate, contrairement à sa faible expression dans le soufre élémentaire. En terme d'acidité, la production totale d'acide sulfurique est stabilisée à pH 2,5 en milieu avec thiosulfate contrairement à 1,5 pour la culture avec soufre élémentaire due au fait de l'état d'oxydation de plus basse énergie du thiosulfate.

Aussi, nous avons analysé l'expression des gènes à deux points d'acidité dans le soufre élémentaire (pH 2,5 et pH 1,5). Nous avons noté un changement important de l'expression des opérons du complexe Sox. La bactérie exprime deux opérons différents, signifiant une adaptation

métabolique au niveau de l'acidité dans le milieu. De plus, le gène *hdrA* est hautement exprimé à pH 1,5 contrairement à pH 2,5. Le changement d'acidité modifie l'expression des gènes du métabolisme du soufre. Ceci suggère qu'*A. thiooxidans* exprime les gènes du métabolisme du soufre dépendamment du niveau d'acidité du milieu et de la conversion du soufre.

Une analyse du reste du transcriptome aux différents niveaux d'acidité a aussi été effectuée pour nous permettre de découvrir de nouvelles pistes d'exploration. Nous constatons une augmentation des gènes codants des composantes des flagelles et de chimiotaxis, en soufre élémentaire à pH 2,5 contrairement à pH 1,5, indiquant probablement une motilité plus élevée. Ce résultat suggère une adaptation de la bactérie au milieu reflétant son activité métabolique.

L'analyse de l'expression des gènes en culture avec thiosulfate révèle la présence de plusieurs gènes codants pour des composantes de cytochromes, indiquant une augmentation de l'expression de la chaîne respiratoire, contrairement à la situation en soufre élémentaire à pH 1,5 et pH 2,5.

Des expériences microscopiques ont été faites pour une analyse semi-quantitative de l'accumulation des globules de soufre chez *A. thiooxidans*. La proportion de globules était plus importante dans la culture en soufre élémentaire contrairement à la culture en thiosulfate. Les bactéries emmagasinent le soufre élémentaire. En milieu avec thiosulfate les bactéries métabolisent le soufre élémentaire produit par leurs réactions enzymatiques, puisque peu de globules sont présents dans le cytoplasme des bactéries.

Ensuite, les analyses biogéochimiques dans les deux milieux de culture révèlent une augmentation de sulfate et d'intermédiaires oxydateurs du soufre (SOI) lorsque le pH diminue. La quantité de sulfate est plus importante dans le milieu avec soufre élémentaire que dans le milieu avec thiosulfate. Nous pouvons corrélérer cette différence de quantité de sulfate avec le

niveau d'acidité des deux milieux. La valeur de pH la plus basse dans la culture avec soufre élémentaire est de 1,5 et la quantité de sulfate est plus importante aussi, alors que dans le milieu avec thiosulfate où le pH diminue jusqu'à 2,5, la quantité de sulfate est moins importante. Aussi, la quantité de SOI est plus élevée dans le premier milieu que dans le second quand on regarde au niveau des valeurs finales d'acidité. En conclusion, à pH égal le milieu avec thiosulfate contient plus de sulfate et de SOI, tandis qu'à pH final, le milieu avec soufre élémentaire contient la plus grande quantité des deux composés.

Bien que notre étude porte sur des analyses transcriptomiques, il existe des limites à l'interprétation des données. Premièrement, pour obtenir une vision globale du métabolisme du soufre, il faudrait plus de points d'analyse pour mieux comprendre la dynamique de l'expression des gènes impliqués au métabolisme. Les trois points d'analyse (soufre élémentaire pH 1,5, pH 2,5 et thiosulfate pH 2,5) ne nous permettent pas une analyse complète de l'adaptation métabolique. Deuxièmement, les analyses transcriptomiques ne tiennent pas compte de la production des protéines et des modifications post-traductionnelles. Les gènes peuvent être exprimés fortement, mais des contrôles post-traductionnels influencent la production des protéines. Pour cette raison, il est indiqué d'analyser la production des enzymes clés, par exemple avec une technique d'immunobuvardage (*Western-blot*). Finalement, des problèmes de biais au niveau de l'alignement des données de la transcriptomique avec le génôme de référence peuvent survenir puisque celui-ci n'est pas complet à 100%.

Notre étude aide à la compréhension générale du métabolisme du soufre chez cette espèce bactérienne. Cependant, cette étude ne peut apporter toutes les réponses aux défis de l'industrie minière. De nouvelles études utilisant un plus grand assortiment de points d'analyse et utilisant d'autres espèces microbiennes devront être effectuées pour concevoir un outil de

dépistage du drainage minier acide, ce qui permettrait une meilleure gestion de ce problème environnemental.

LISTE BIBLIOGRAPHIQUE

Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Pribelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19(5):455-477.

Blankenberg D, Von Kuster G, Coraor N, Ananda G, Lazarus R, Mangan M et al. (2010). "Galaxy: a web-based genome analysis tool for experimentalists". *Current Protocols in Molecular Biology* Chapter 19:Unit 19.10.1-21.

Bobadilla Fazzini RA, Cortés MP, Padilla L, Maturana D, Budinich M, Maass A et al. (2013). Stoichiometric modeling of oxidation of reduced inorganic sulfur compounds (Riscs) in *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Biotechnol Bioeng* 110(8):2242-2251.

Bolger AM, Lohse M, Usadel B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15):2114-2120.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55(4):611-622.

Chen L, Ren Y, Lin J, Liu X, Pang X, Lin J. (2012). *Acidithiobacillus caldus* sulfur oxidation model based on transcriptome analysis between the wild type and sulfur oxygenase reductase defective mutant. PLoS One 7(9):e39470.

Conseil des ressources humaines de l'industrie minière (RHIM). (2015). Faits et chiffres sur l'industrie minière et ses emplois: Un contributeur à la prospérité économique du Canada. <http://www.acareerinmining.ca/fr/industry/factsfigures.asp>. Site web consulté en février 2015.

Desroche N, Beltramo C, Guzzo J. (2005). Determination of an internal control to apply reverse transcription quantitative PCR to study stress response in the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. J Microbiol Methods 60(3):325-333.

Dopson M, Johnson DB. (2012). Biodiversity, metabolism and applications of acidophilic sulfur-metabolizing microorganisms. Environ Microbiol 14(10):2620-2631.

Environmental Mining Council of British Columbia. (2000). Acid Mine Drainage: *Mining and Water Pollution Issues in BC*. http://dwb4.unl.edu/Chem/CHEM869R/CHEM869RLinks/emcbc.miningwatch.org/emcbc/library/amd_water.htm. Site web consulté en février 2015.

Giardine B, Riemer C, Hardison RC, Burhans R, Elnitski L, Shah P et al. (2005). "Galaxy: a platform for interactive large-scale genome analysis." Genome Research 15(10):1451-1455.

Goecks, J, Nekrutenko, A, Taylor, J and The Galaxy Team. (2010). Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol* 11(8):R86.

Hedrich S, Schlömann M, Johnson DB. (2011). The iron-oxidizing proteobacteria. *Microbiology* 157(Pt 6):1551-1564.

Holkenbrink C, Barbas SO, Mellerup A, Otaki H, Frigaard NU. (2011). Sulfur globule oxidation in green sulfur bacteria is dependent on the dissimilatory sulfite reductase system. *Microbiology* 157(Pt 4):1229-1239.

Johnson DB, Hallberg KB. (2003). The microbiology of acidic mine waters. *Res Microbiol* (154)7:466-473.

Johnson DB, Hallberg KB. (2005). Acid mine drainage remediation options: a review. *Sci Total Environ* (338)1-2:3-14.

Jones D, Schaperdoth I, Macalady J. (2014). Metagenomic evidence for sulfide oxidation in extremely acidic cave biofilms. *Geomicrobiology Journal* 31:194-204.

Ko MS, Park HS, Kim KW, Lee JU. (2013). The role of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in arsenic bioleaching from soil. *Environ Geochem Health* 35(6):727-733.

Korehi H, Blöthe M, Sitnikova MA, Dold B, Schippers A. (2013). Metal Mobilization by Iron- and Sulfur-Oxidizing Bacteria in a Multiple Extreme Mine Tailings in the Atacama Desert, Chile. *Environ Sci Technol* 47(5):2189-2196.

Mäder U, Nicolas P, Richard H, Bessi res P, Aymerich S. (2011). Comprehensive identification and quantification of microbial transcriptomes by genome-wide unbiased methods. *Curr Opin Biotechnol* 22(1):32-41.

Mangold S, Valdés J, Holmes DS, Dopson M. (2011). Sulfur metabolism in the extreme acidophile *Acidithiobacillus caldus*. *Front Microbiol* 2:17:1-18.

Oelkers E, Helgeson H, Shock E, Sverjensky D, Johnson J, Pokrovskii V. (1995). Summary of the apparent standard partial molar gibbs free energies of formation of aqueous species, minerals, and gases at pressures 1 to 5000 bars and temperatures 25 to 1000  C. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 24(4).

Orellana LH, Jerez CA. (2011). A genomic island provides *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 additional copper resistance: a possible competitive advantage. *Appl Microbiol Biotechnol* 92(4):761-767.

Quatrini R, Appia-Ayme C, Denis Y, Jedlicki E, Holmes DS, Bonnefoy V. (2009). Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *BMC Genomics* 10:394:1-19.

Rawlings DE, Johnson DB. (2007). The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. *Microbiology* 153:315-324.

Rethmeier, J., Rabenstein, A., Langer, M., & Fischer, U. (1997). Detection of traces of oxidized and reduced sulfur compounds in small samples by combination of different high-performance liquid chromatography methods. *Journal of chromatography A* 760(2):295-302.

Rohwerder T, Sand W. (2003). The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from *Acidithiobacillus* and *Acidiphilium* spp. *Microbiology* 149(Pt 7):1699-1710.

Rzhepishevska OI, Valdés J, Marcinkeviciene L, Gallardo CA, Meskys R, Bonnefoy V et al. (2007). Regulation of a novel *Acidithiobacillus caldus* gene cluster involved in metabolism of reduced inorganic sulfur compounds. *Appl Environ Microbiol* 73(22):7367-7372.

Seemann T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30(14):2068-2069.

Smith CJ, Osborn AM. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* 67(1):6-20.

Song L, Florea L. (2015). Rcorrector: efficient and accurate error correction for Illumina RNA-seq reads. *Gigascience* 19(4):48.

Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N. & Holt, J.G. (1989). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1st ed, vol. 3. Williams and Wilkins. Baltimore, pp 1842-1858.

Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M. (2010). A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* 50(4):S1-S5.

Valdés J, Pedroso I, Quatrini R, Dodson RJ, Tettelin H, Blake R 2nd et al. (2008). *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics* 9:597:1-24.

Valdés J, Quatrini R, Hallberg K, Dopson M, Valenzuela PD, Holmes DS. (2009). Draft genome sequence of the extremely acidophilic bacterium *Acidithiobacillus caldus* ATCC 51756 reveals metabolic versatility in the genus *Acidithiobacillus*. *J Bacteriol* 191(18):5877-5878.

Valdés J, Ossandon F, Quatrini R, Dopson M, Holmes DS. (2011). Draft genome sequence of the extremely acidophilic biomining bacterium *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 19377 provides insights into the evolution of the *Acidithiobacillus* genus. *J Bacteriol* 193(24):7003-7004.

Weissgerber T, Zigann R, Bruce D, Chang YJ, Detter JC, Han C et al. (2011). Complete genome sequence of *Allochromatium vinosum* DSM 180(T). *Stand Genomic Sci* 5(3):311-330.

Yin H, Zhang X, Li X, He Z, Liang Y, Guo X et al. (2014). Whole-genome sequencing reveals novel insights into sulfur oxidation in the extremophile *Acidithiobacillus thiooxidans*. BMC Microbiol 14:179:1-14.

Yin H, Zhang X, Liang Y, Xiao Y, Niu J, Liu X. (2014). Draft Genome Sequence of the Extremophile *Acidithiobacillus thiooxidans* A01, Isolated from the Wastewater of a Coal Dump. Genome Announc 2(2).

You XY, Guo X, Zheng HJ, Zhang MJ, Liu LJ, Zhu YQ et al. (2011). Unraveling the *Acidithiobacillus caldus* complete genome and its central metabolisms for carbon assimilation. J Genet Genomics 38(6):243-252.